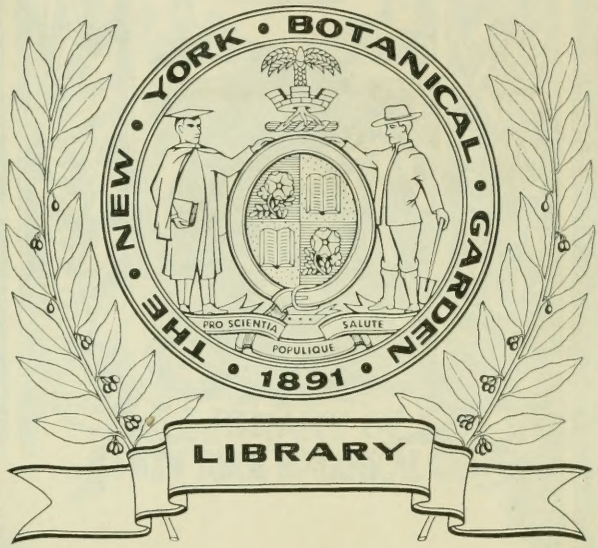
QK753
.B7
A35




LIBRARY

Série A, n° 623
N° d'ordre :
1.359

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DES SCIENCES
## DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

## LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

**Henri AGULHON**
PRÉPARATEUR A L'INSTITUT PASTEUR

---

**1re THÈSE.** — Recherches sur la présence et le rôle du bore chez les végétaux.

**2e THÈSE.** — Propositions données par la Faculté.

---

**Soutenues le 4 février 1910 devant la Commission d'examen**

MM. G. BONNIER . . . . *Président.*
HAUG. . . . . } *Examinateurs.*
Gabriel BERTRAND . }

---

LAVAL
L. BARNÉOUD & Cie, IMPRIMEURS
8, RUE RICORDAINE, 8

1910

ZT
17
5

Série A, n° 623
N° d'ordre :
1.359

# THÈSES

PRÉSENTÉES

## A LA FACULTÉ DES SCIENCES
## DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

## LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

**Henri AGULHON**
PRÉPARATEUR A L'INSTITUT PASTEUR

---

**1re THÈSE.** — Recherches sur la présence et le rôle du bore chez les végétaux.

**2e THÈSE.** — Propositions données par la Faculté.

---

**Soutenues le 4 février 1910 devant la Commission d'examen**

MM. G. BONNIER . . . . *Président.*
HAUG. . . . . } *Examinateurs.*
Gabriel BERTRAND . }

---

NEW YORK BOTANICAL GARDEN LIBRARY

LAVAL
L. BARNÉOUD & Cie, IMPRIMEURS
8, RUE RICORDAINE, 8

1910

A35

# FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

| | MM. | |
|---|---|---|
| *Doyen* | P. APPELL, *Profess.* | Mécanique rationnelle. |
| *Doyen honoraire* | G. DARBOUX. — | Géométrie supérieure |
| *Profess. honoraires* | L. TROOST. | |
| | Ch. WOLF. | |
| | J. RIBAN. | |
| *Professeurs* | LIPPMANN | Physique. |
| | BOUTY | Physique. |
| | BOUSSINESQ | Phys. mathém. et calcul des probabilités. |
| | PICARD | Analyse supér. et algèbre supérieure. |
| | H. POINCARÉ | Astronomie mathém. et mécan. céleste. |
| | Y. DELAGE | Zoologie, anatomie, physiologie compar. |
| | G. BONNIER | Botanique. |
| | DASTRE | Physiologie. |
| | KOENIGS | Mécanique physique et expérimentale. |
| | VÉLAIN | Géographie physique. |
| | GOURSAT | Calcul différentiel et calcul intégral. |
| | CHATIN | Histologie. |
| | HALLER | Chimie organique. |
| | JOANNIS | Chimie (Enseignement P. C. N.). |
| | JANET | Physique — — |
| | WALLERANT | Minéralogie. |
| | ANDOYER | Astronomie physique. |
| | PAINLEVÉ | Mathématiques générales. |
| | HAUG | Géologie. |
| | TANNERY | Calcul différentiel et calcul intégral. |
| | RAFFY | Application de l'analyse à la géométrie. |
| | HOUSSAY | Zoologie. |
| | H. LE CHATELIER. | Chimie. |
| | G. BERTRAND | Chimie biologique. |
| | Mme P. CURIE | Physique générale. |
| | CAULLERY | Zoologie (Évolution des êtres organisés) |
| | C. CHABRIÉ | Chimie appliquée. |
| | G. URBAIN | Chimie. |
| | BOREL | Théorie des fonctions. |
| | MARCHIS | Aviation. |
| | N. | Physique. |
| | N. | Zoologie, anatomie, physiol. comparée |
| *Professeurs-adjoints* | PUISEUX | Physique céleste. |
| | LEDUC | Physique. |
| | MATRUCHOT | Botanique. |
| | MICHEL | Minéralogie. |
| | G. PRUVOT | Anatomie comparée. |
| *Secrétaire* | A. GUILLET. | |

A MONSIEUR LE DOCTEUR E. ROUX

MEMBRE DE L'INSTITUT ET DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

DIRECTEUR DE L'INSTITUT PASTEUR

A MONSIEUR GABRIEL BERTRAND

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES

CHEF DE SERVICE A L'INSTITUT PASTEUR

*Hommage de respectueuse reconnaissance.*

SZT
8717
115

# INTRODUCTION

§ Ier. — A. — *Composition élémentaire des êtres vivants : éléments plastiques et éléments catalytiques.*
B. — *Utilité et rôle des éléments : méthode analytique et méthode synthétique.*
§ II. — *Application pratique : les engrais catalytiques.*

## § Ier

A. — Les méthodes de la chimie analytique nous permettent d'isoler, de caractériser et de doser les éléments qui entrent dans la composition des êtres vivants. On a pu ainsi déceler dans le règne animal et le règne végétal, une trentaine environ des 78 corps simples connus. Certains, présents en quantités importantes, forment de leurs multiples combinaisons la masse des principes immédiats, d'autres, en faibles quantités, parfois seulement à l'état de traces, ne paraissent pas pouvoir prendre une part passive à l'édification des tissus. Aux premiers nous réserverons le nom d'ÉLÉMENTS PLASTIQUES.

L'*hydrogène*, l'*oxygène*, le *carbone*, l'*azote* se placent en tête de cette catégorie de corps simples : la combinaison des deux premiers donne l'eau, indispensable milieu de l'activité cellulaire ; alliés au troisième, ils forment la série des composés ternaires, partie quantitativement la plus importante des principes immédiats, et la copulation des quatre éléments fait naître d'innombrables individus chimiques, parmi lesquels les matières protéiques. A côté de ces éléments primordiaux nous rangeons le *soufre*, le *phosphore*, le *chlore*, le *silicium* parmi les métalloïdes, le *calcium*, le *magnésium*, le *sodium* et le *potassium* parmi les métaux. Le soufre entre dans la com-



OCT 2 3 1962

position des albumines ; le phosphore est présent dans les nucléoalbuminoïdes du noyau des cellules et dans les lécithines dont on commence à entrevoir le rôle biologique considérable ; à l'état de phosphates il sert à l'édification du squelette des Vertébrés. Le chlore, allié au sodium ou au potassium, se trouve à l'état de chlorures dans tous les liquides végétaux et animaux. La silice imprègne les cellules épidermiques des Graminées ; elle forme le squelette des Diatomées, des Foraminifères, de certaines éponges. Le calcium, accompagné d'un peu de magnésium, à l'état de carbonates et de phosphates, édifie le squelette des Vertébrés, l'exosquelette des Crustacés, la coquille des Mollusques. Outre cette utilité plastique, on commence à connaître quel rôle important jouent les sels de chaux et les phosphates dans les actions diastasiques, et ceci nous amène à envisager une activité possible des éléments dans les réactions chimiques du milieu vital, qui ne nécessite pas leur présence en forte quantité : une activité dite de présence, un rôle catalytique. C'est le seul que nous puissions supposer aux éléments dont on ne trouve chez les êtres vivants que de très faibles quantités, et c'est sous le nom d'ÉLÉMENTS CATALYTIQUES (1) que nous allons ranger l'ensemble de ces corps qui nous restent à énumérer. Nous donnerons tout à l'heure des raisons plus précises du bien-fondé de cette dénomination.

Le *fer* est universellement répandu : dans le règne animal, il entre dans la composition de l'hémoglobine du sang ; BUNGE en trouve dans l'œuf de poule à l'état d'une combinaison organique qu'il appelle l'hématogène ; STOKLASA extrait des végétaux une substance analogue à cette dernière.

L'existence du *manganèse* dans toutes les cendres végétales et principalement dans celles des jeunes pousses ne laisse aucun doute depuis les travaux de MAUMENÉ, G. BERTRAND,

1. La classification en Eléments plastiques et Eléments catalytiques est enseignée par M. G. BERTRAND à la Faculté des Sciences de Paris depuis plusieurs années.

Pichard, Griffiths. Ce dernier découvre chez la *Pinna squamosa* un pigment sanguin à base de manganèse.

Le *cuivre* a été trouvé dans des espèces végétales variées par Sarzeaud, Grandeau, Duclaux, Galippe, Lehmann, Passerini, etc. Il entre dans la composition du sang des Mollusques et des Crustacés.

Berthelot et André ont dosé l'*aluminium* dans un certain nombre de végétaux.

Le *zinc*, signalé par Forshammer dans les plantes marines, par Lechartier et Bellamy, par Demarçay dans les plantes terrestres, a été décelé et dosé dans des végétaux variés, poussés dans des sols très divers, par Javillier. Bradley, Lechartier et Bellamy, Raoult et Breton le trouvent dans le règne animal.

L'analyse spectrale a permis la caractérisation de traces de *rubidium* (Grandeau), de *cæsium*, de *strontium*, de *baryum*, de *lithium* (Bunsen et Kirchoff, Passerini), de *vanadium*, de *molybdène* et de *chromie* (Demarçay) dans les cendres végétales.

L'*argent* a été signalé dans les plantes marines et terrestres par Malaguti, Durocher et Sarzeaud; le *plomb* dans le foie humain et chez certaines plantes.

Enfin, parmi les métalloïdes, l'*iode* existe chez les végétaux marins et les végétaux d'eau douce (Chatin). Bourcet, dans 235 analyses de plantes, caractérise et dose l'iode dans 110 cas. Chez les animaux, la thyroïdine et l'acide gorgonique sont des principes immédiats organiques iodés.

Le *brome*, présent chez les végétaux marins, a été trouvé par Bourcet dans la glande thyroïde et Friedlander a extrait du Murex une substance organique riche en cet élément.

Le *fluor* existe chez les animaux dans les dents et les os.

La question de la présence normale de l'*arsenic* à l'état de traces dans les tissus vivants, qui fit l'objet de si longues controverses, a été résolue par l'affirmative et sans qu'aucun doute puisse subsister par les recherches de M. Gabriel Bertrand.

Quant au *bore* qui fait l'objet de ce travail, nous verrons

qu'il a été signalé par de nombreux auteurs chez les végétaux.

B. — Lorsque par les méthodes d'analyse on est arrivé à déterminer tous les éléments présents dans un être vivant, on n'est pas en droit de conclure que chacun de ces éléments a un rôle dans la vie de cet individu. La méthode analytique doit être doublée de la méthode synthétique, et c'est de l'ensemble des résultats acquis par l'application des deux méthodes qu'on peut tirer la démonstration de l'utilité d'un élément. Chaque corps devra être pris à part, supprimé ou ajouté aux milieux synthétiques dans lesquels on cultivera l'être vivant (plante ou végétal inférieur). Lorsque chaque élément trouvé aura été ainsi étudié en détail et pour le plus grand nombre d'individus possible, on pourra répondre aux deux grandes questions de biologie générale qui peuvent s'énoncer en ces termes :

Y a-t-il unité de composition absolue entre les divers êtres vivants ?

Et en cas de réponse affirmative : Quelle est la composition nécessaire et suffisante de la matière vivante ?

Les éléments plastiques ont reçu cette démonstration d'utilité. Elle n'a été faite que pour quelques-uns seulement des éléments catalytiques, et encore est-elle le plus souvent incomplète.

On connaît l'utilité du *fer*, sans lequel la plante ne forme pas de chlorophylle. On sait celle que le *zinc* présente dans la culture de l'*Aspergillus niger* depuis les expériences de Raulin, puis de Javillier. Ce dernier a étendu l'utilité de cet élément à la culture des levures et même des plantes supérieures, dans certaines conditions. De Heen et Micheels ont montré l'influence favorisante de certains sels métalliques à l'état colloïdal sur la germination.

Le *fluor* à l'état de fluorures accroît, d'après Effront, l'activité des levures à petites doses ; d'après Salm-Horstmar, il est utile au développement complet du pois et de l'orge.

L'action favorisante du *manganèse* sur le développement des végétaux supérieurs est bien connue depuis les expériences de G. Bertrand, de Lœw, d'Aso, de Nagaoka et Sawa, de Kantor, de Hills, de Gœssl et de Passerini. Pour cet élément on possède de plus une indication précise sur la manière dont il agit et son rôle physiologique. C'est à ce point de vue le seul élément qui soit bien connu.

G. Bertrand a signalé, dans ses études sur la laccase, la richesse en manganèse des cendres des préparations de cette diastase. Il a démontré ensuite que leur activité est proportionnelle à leur teneur en cet élément; par précipitations fractionnées il obtient des portions presque inactives, et ce sont celles qui ne contiennent presque plus de manganèse; par addition d'une trace d'un sel de ce métal, ces portions sont susceptibles de recouvrer leur activité. La laccase se comporte comme une combinaison de manganèse et d'un radical organique lié à celui-ci à la façon d'un acide faible. Le manganèse joue le rôle de transporteur d'oxygène dans l'action oxydante de la laccase : sa substance n'est pas entraînée dans la réaction et il peut ainsi produire en quantité infime des actions considérables; en un mot c'est un agent catalytique. De là l'origine de ce nom d'éléments catalytiques appliqué aux corps qui, comme le manganèse, se trouvent chez les êtres vivants en faible quantité et présentent pourtant une utilité non en rapport direct avec leur masse.

Tels sont les faits actuellement connus ; on voit quel large champ inexploré est encore ouvert aux chercheurs.

## § II

La connaissance exacte des éléments qui possèdent un rôle dans l'édification des êtres vivants n'est pas seulement d'un intérêt théorique. L'agriculture, partie importante de la biologie appliquée, doit tirer et a déjà tiré des études faites à ce sujet un énorme profit.

Les travaux de Boussingault et de Georges Ville, repris partout et par de nombreux auteurs, sur l'utilité des matériaux azotés (sels d'ammoniaque et azotates), des phosphates, des sels de chaux et de potasse demandent à être élargis. Ils ont amené une conception trop restreinte de l'engrais complet. « Il ne me paraît pas démontré », disait Raulin (1), « que l'azote, l'acide phosphorique, la potasse, la chaux, constituent seuls un engrais complet et suffisant ». L'engrais chimique dit complet se compose en effet uniquement de sels ammoniacaux ou de nitrates, d'une substance apportant du phosphore (phosphates, superphosphates), et de sels de potasse (chlorure ou sulfate). L'application de tout ou partie de cet engrais, en un mot, l'application de l'engrais chimique pur à la terre a donné lieu à des insuccès frappants. Plus que jamais, l'agriculture a recours aux engrais naturels, recherchant tous les résidus d'industrie et de culture utilisables : tourteaux, résidus de récoltes, excréments, débris végétaux et animaux de toute sorte. Pour expliquer la quasi faillite de l'engrais chimique pur, on invoque des questions physiques qui ne sont pas d'ailleurs sans être plausibles ; mais, ne faudrait-il pas à côté invoquer des raisons d'ordre purement chimiques que Raulin a déjà exposées il y a quarante ans ? L'engrais se définit : la matière qui manque au sol et utile à la plante. La suite des cultures faites sur un même terrain n'enlève-t-elle à la terre que les éléments que lui rendra l'engrais chimique dit complet ? L'analyse nous a montré que le nombre des corps extraits par la plante est bien plus considérable : le sol s'épuise donc aussi en ces éléments, plus ou moins rapidement, il est vrai, étant donné la faible quantité enlevée, mais cependant de façon appréciable, car des corps comme le fluor, le manganèse, le bore ne sont pas répandus en quantité abondante dans les terrains ordinaires. N'est-il donc pas nécessaire de les leur rendre de temps en temps : l'engrais naturel le fait et c'est peut-être la grande cause de sa supé-

1. Thèse Paris, 1870, p. 54.

riorité. De là l'intérêt de connaître les éléments qui sont utiles à la plante afin de rendre au sol ceux-là seulement. L'emploi de la méthode synthétique introduit ainsi une notion nouvelle en agriculture. A côté de l'engrais plastique complet, trouveront place des engrais que l'on peut appeler *catalytiques*, puisqu'ils seront chargés d'apporter les éléments auxquels on a donné ce nom, ou *complémentaires* puisqu'ils doivent compléter réellement l'engrais chimique appelé complet jusqu'à ces derniers temps.

Sous l'impulsion donnée par M. G. Bertrand au Congrès de chimie appliquée tenu à Berlin en 1903, de nombreuses expériences ont été faites sur l'emploi du manganèse comme agent fertilisateur du sol proposé par ce savant. Pour donner une idée de l'importance que peut avoir l'emploi d'un engrais complémentaire, disons qu'Aso a obtenu sur du riz des augmentations de récolte de 42 o/o sous l'influence de quelques millièmes de manganèse. M. G. Bertrand a obtenu avec M. Thomassin, dans les conditions de la grande culture une augmentation de récolte de 22,5 o/o pour une culture d'avoine. Depuis, les expériences sur l'emploi du manganèse comme engrais se sont multipliées un peu partout. Lœw et ses élèves, Nagaoka, Sawa, Katayama, au Japon, Kanter, Hill, Vœlcker, Gössl, Passerini, Giglioni, Salomone, Stoklasa, Molinari et Ligot en Europe, Withney aux Etats-Unis, en France Garola, Marie, Grandeau, Lesage apportent des documents intéressants sur la valeur du manganèse dans les conditions de la culture pratique. Les plus récents de ces travaux se trouvent rassemblés dans les comptes rendus du Congrès de chimie appliquée tenu à Londres en juin 1909. Les expériences de Javillier en milieu synthétique liquide sur du blé font prévoir une possibilité d'emploi du zinc comme engrais catalytique, plus limité il est vrai que celui du manganèse.

Cette nouvelle notion pratique ne peut que gagner à être étendue à d'autres éléments.

*
* *

L'importance théorique et pratique que peut présenter l'étude systématique d'un élément au double point de vue de sa présence et de son rôle chez les êtres vivants ne paraît pas douteuse. C'est de l'ensemble de nombreux travaux de ce genre que pourra s'édifier la connaissance rationnelle de la composition chimique de la matière vivante. Le bore dont la constance paraît avoir été établie chez les végétaux par certains auteurs n'a été l'objet d'aucun travail d'ensemble dans cet ordre d'idées.

L'étude présente a pour but :

1° Dans une première partie, de mettre au point la question, déjà étudiée et sur laquelle se sont élevées maintes controverses, de la présence normale du bore chez les végétaux. C'est la partie analytique.

2° Dans une seconde partie, c'est la partie synthétique, de rechercher si le bore est un élément indispensable ou tout au moins utile à la vie végétale. En passant nous verrons ce qu'on peut penser de son action antiseptique.

3° Dans une troisième partie, d'essayer de définir son rôle si nous lui avons trouvé une utilité.

Qu'il me soit permis ici de remercier M. Gabriel Bertrand, qui m'a initié à la recherche chimique et biologique : c'est lui l'instigateur de ce travail. En 1903, au Congrès de Berlin, il citait déjà le bore comme l'un des corps auxquels on était en droit de supposer un rôle physiologique. Je lui sais gré de m'avoir cru capable de mener à bien cette partie de tout un grand programme qu'il s'est tracé dans cette voie et j'espère ne pas avoir trop déçu son attente.

C'est auprès de M. le Dr Roux, directeur de l'Institut Pasteur et de M. Bertrand que j'ai trouvé les appuis moral et matériel qui m'étaient nécessaires. Je les prie de me permettre d'inscrire leur nom en tête de ce travail, en témoignage de respectueuse reconnaissance et de profond dévouement.

# PREMIÈRE PARTIE

## MÉTHODE ANALYTIQUE : RECHERCHE ET DOSAGE DU BORE CHEZ LES VÉGÉTAUX

---

## CHAPITRE PREMIER

### LES MÉTHODES DE RECHERCHE DU BORE

#### § Ier. — Etat du bore dans la nature

Le bore ne se rencontre pas à l'état libre dans la nature ; il se trouve à l'état d'acide borique et de borates. Les suffioni de Toscane sont la principale source industrielle d'acide borique ; cet acide existe encore à l'état non combiné en petites quantités sous formes de cristanx tricliniques (sassoline), en grandes quantités à l'état de borate de soude $B^4O^7Na^2 + 10H^2O$ dans le Thibet et la Californie (tinkal), de borate de chaux hydraté (pandermite) en Asie mineure ; la boronatrocalcite (Amérique du Nord et République Argentine) et la boracite sont l'un un borate de soude associé à un borate de chaux $B^4O^7Na^2 + 2(B^4O^7Ca) + 18H^2O$, l'autre un composé riche en magnésium de formule $4(B^4O^7Mg) + MgCl^2, 2MgO$. La rhodizite (Sibérie) est un borate de calcium. La tourmaline est un boro-silicate d'alumine et d'une base alcaline ou alcalino-ter-

reuse ; l'axinite est un borosilicate d'alumine et de chaux. La datholite est un silico-borate de chaux.

La recherche du bore dans les matériaux naturels paraît donc devoir se ramener à celle de l'acide borique et de ses sels. Nous verrons d'ailleurs que c'est à cet état que de nombreux auteurs l'ont trouvé disséminé à la surface du globe.

### § II. — Quelques propriétés générales de l'acide borique

L'acide borique, soluble dans l'eau, l'alcool, la glycérine, est un acide faible : la chaleur de neutralisation d'une molécule de soude par une molécule d'acide borique est égale à 11,6 calories. Il ne fait pas virer l'hélianthine et rougit à peine le tournesol (1) ; on a même proposé les solutions de borax comme liqueurs de base pour l'acidimétrie en présence d'hélianthine, et réciproquement, avec ce réactif on peut doser l'alcali combiné avec l'acide borique directement par un acide fort titré (2). Les borates alcalins sont solubles dans l'eau. Avec les sels de baryum, de calcium, le nitrate d'argent (3), l'acétate de plomb, le sulfate de manganèse, les solutions de borates alcalins donnent des précipités blancs qui possèdent le caractère, que je n'ai trouvé indiqué dans aucun manuel d'analyse, d'être redissous par l'addition à la liqueur d'un peu de glycérine ou d'une solution de mannite. La formation de ces précipités nécessite une liqueur concentrée de borates : ils sont facilement dissociables par l'eau. Nous ne nous arrêterons donc pas à ces propriétés pour arriver de suite aux caractères de l'acide borique qui sont doués d'une grande sensibilité et qu'il nous sera possible d'appli-

1. A. Joly. Action de l'acide borique sur quelques réactifs colorés. — *C. R. Ac. des Sc.*, t. C, p. 103, 1885.
2. T. Thomson. *Chem. News*, 1883, p. 135.
3. H. Rose. *Annales de Chim. et Phys.*, 2e série, t. XLVI, 1831.

quer à sa recherche dans les végétaux où nous ne pouvons espérer le trouver qu'à l'état de traces, à savoir :

1° La couleur verte qu'il donne aux flammes dans lesquelles on le volatilise et qui possède un spectre particulier ;

2° La coloration qu'il communique au papier de curcuma.

## § III. — Méthodes de recherche à la flamme et au spectroscope

### A. — Historique

La coloration verte que l'acide borique donne à la flamme de l'alcool dans lequel on l'a mis en dissolution est connue de longue date. J'en ai trouvé la première mention dans un ouvrage paru en 1774 (1); l'auteur en attribue la découverte à Geoffroy et Pott. Elle avait vivement frappé les chimistes de cette époque et, dans leur non-connaissance de la constitution du sel sédatif (acide borique), ils dissertaient longuement sur la présence de cuivre dans cette substance. Cadet opinait pour la présence du cuivre, Model et Baumé soutenaient la théorie contraire. Lavoisier, en 1793, se rallie aux idées de ces deux derniers : « L'acide borique a la propriété de communiquer à la flamme de l'alcool dans lequel on l'a dissous une couleur verte, et cette circonstance avait fait croire qu'il contenait du cuivre ; mais aucune expérience décisive n'a confirmé ce résultat ; il y a apparence que si le borax contient quelquefois du cuivre, il lui est accidentel. » (2)

Ed. Turner (3) donne une méthode pour reconnaître les borates au chalumeau ; il les mêle à une partie de spath-fluor en poudre et quatre parties et demie de bisulfate de potasse ; on détrempe le tout dans un peu d'eau et on l'ex-

1. *Récréations chimiques* par Model, traduit de l'allemand avec des observations et des additions par Parmentier. Paris, 1774, t. II, pp. 96 et 180.

2. Lavoisier. *Traité élémentaire de Chimie*, t. I, p. 266. Paris, 1793.

3. *Pogg. Annal.* VI, p. 845.

pose sur un fil de platine à la pointe de la flamme intérieure ; peu de temps après la fusion, on voit se manifester autour de la flamme une couleur verte qui ne tarde pas à s'effacer et ne reparaît plus. C'est le premier procédé donné pour reconnaître une petite quantité de borax. La méthode considérée comme la plus sûre pour la recherche de l'acide borique par H. Rose (1), vers 1845, est la flamme de l'alcool en milieu acidifié par l'acide sulfurique, « bien que, déclare-t-il, une coloration analogue soit donnée par les sels de cuivre ». Merz (2), en 1860, dans un mémoire destiné à compléter l'analyse au chalumeau de Berzélius, donne comme caractère de l'acide borique la coloration verte que communique à la flamme extérieure d'un bec Bunsen une parcelle d'acide borique qu'on en approche sur un fil de platine.

Stolba (3) donne une méthode pour la recherche dans les milieux complexes. Il broie la substance contenant l'acide borique avec du fluosilicate d'ammonium et chauffe le mélange dans un petit tube ; on obtient un sublimé renfermant le bore à l'état de fluoborate d'ammonium. Ce sublimé colore la flamme en vert et, additionné d'une goutte d'acide chlorhydrique, il donne la réaction du curcuma. Bidaud (4) signale la sensibilité de la flamme du gaz d'éclairage à l'acide borique et insiste sur ce fait qu'il n'est pas nécessaire d'introduire la substance en pleine flamme, mais seulement sur les bords ; il donne comme limite de la sensibilité 7/100 de milligramme d'acide borique.

Lecoq de Boisbaudran (5) emploie la méthode de Bidaud pour étudier le spectre de l'acide borique. La même année, 1873, V. Merz et Weitt (6) rappellent l'attention sur l'emploi

1. H. Rose. *Traité pratique d'analyse chimique*, traduction Jourdan, t. I, p. 241 ; Paris 1843.
2. *J. fur praktische Chem.*, t. LXXX, p. 487, 1860.
3. *Zeitsch f. anal. Chem.*, t. IX, p. 95, 1870.
4. *C. R. Ac. des Sc.*, t. LXXVI, p. 489. 1873.
5. *C. R. Ac. des Sc.*, t. LXXVI, p. 833, 1873.
6. *Ber. Deutsch. ch. Ges.*, 1873, p. 1518.

de la flamme de l'alcool en présence de l'acide sulfurique. Kammerer (1) donne comme très sensible la coloration verte obtenue dans la flamme extérieure du bec Bunsen par le fluorure de bore, produit directement par un mélange de spath-fluor et d'acide sulfurique sur la boucle de platine. M. W. Iles (2) étudie, en 1876, le spectre de l'acide borique en approchant d'une flamme de gaz un mélange d'acide borique et de glycérine fait directement sur une petite spatule de platine.

En 1877, Dieulafait (3), à l'occasion d'un travail général sur la présence de l'acide borique dans les mers actuelles, met au point les méthodes de recherche ordinairement employées. Il avait affaire dans l'eau de mer au cas d'un mélange salin complexe dans lequel se trouvait l'acide borique en très faible quantité. Il le recherche sans l'isoler, directement dans les eaux mères de salines. Il déclare abandonner la méthode de la flamme de l'alcool à cause de son incertitude ; elle n'est en effet pas intégralement spécifique : la présence d'oxyde de cuivre, de thallium, d'acide tellureux, de baryte, d'acide molybdique ou d'acide phosphorique peut communiquer à la partie supérieure de la flamme une teinte verte analogue à celle de l'acide borique. Il retient et amène à une très grande sensibilité la méthode de recherche au spectroscope et la méthode de la coloration verte de la flamme d'hydrogène. La flamme verte de l'acide borique examinée au spectroscope présente une série de belles bandes vertes allant en décroissant du rouge au violet, et dont les trois premières, vers le rouge, sont principalement visibles (bandes $\alpha$, $\beta$ et $\gamma$). Elles sont d'autant plus caractéristiques qu'elles sont à égale distance les unes des autres. Dieulafait forme sur un fil de platine un champignon spongieux de magnésie en séchant à l'intérieur d'un bunsen l'extrémité du fil, trempée à plusieurs reprises dans une solution de chlorure de magnésium saturée.

1. *Zeitsch. anal. Chem.* 1873, p. 376
2. *Am. Chemist.*, VI, p. 361.
3. *Annales de Chim. et Phys.*, 5e série, t. XII, p. 318, 1877.

Sur ce champignon il amène une goutte du liquide à examiner et le porte dans la flamme en examinant celle-ci au spectroscope. Les trois bandes apparaissent pour une quantité de bore allant jusqu'à 2,5 millièmes de milligramme pour des solutions d'acide borique pur, quantité absolue présente sur le champignon de magnésie. Pour rechercher le bore engagé dans de grandes masses salines en petite quantité, Dieulafait, par des concentrations et des cristallisations successives, amène le liquide à une dernière goutte où se trouve l'acide borique, mais dans ce cas il ne faut pas compter déceler moins de 0 mgr, 005. Il obtient par sa méthode de la flamme d'hydrogène, une plus grande sensibilité. L'acide borique est libéré, dans le mélange salin obtenu après les concentrations, par addition d'acide sulfurique. Le mélange est alors approché d'un brûleur Bunsen alimenté par de l'hydrogène pur, et maintenu dans la partie extérieure et invisible de la flamme ; l'acide borique se volatilise lentement et donne la coloration caractéristique. On devra toujours se tenir à une distance telle de la flamme que la coloration jaune du chlorure de sodium n'apparaisse pas. La limite inférieure de la réaction est 1 millième de milligramme de bore, quantité absolue présente sur le fil de platine. Cette méthode est applicable à la spectroscopie, car dans ce cas le spectre de l'acide borique apparaît seul, ce qui est un avantage immense. L'obtention simultanée de la flamme verte et du spectre caractéristique ne laisse aucun doute sur la nature de la coloration. Les travaux postérieurs à ceux de Dieulafait n'ont jamais atteint une aussi grande sensibilité.

Salet (1) donne le spectre détaillé de l'acide borique. Pour l'obtenir il revient au procédé de Kammerer : il produit dans un petit tube du fluorure de bore en mélangeant la substance contenant l'acide borique avec du spath fluor finement pulvérisé et de l'acide sulfurique. On chauffe légèrement et on entraîne par un courant de gaz le fluorure de bore formé ; le

1. *Agenda du Chimiste*, 1879.

gaz qui a entraîné le fluorure brûle vert et permet l'observation du spectre.

Villiers et Fayolle (1) perfectionnent la méthode de la flamme de l'alcool pour la recherche dans les milieux complexes, comme les cendres de vin. Ils emploient l'entraînement préalable en présence d'acide sulfurique à l'état d'éther méthylique, ce qui sépare l'acide borique des corps pouvant communiquer à la flamme une coloration analogue. Ils donnent comme limite de la sensibilité de leur méthode le 1/10 de milligramme.

Castellana en 1906 (2) mélange, dans un petit tube, au complexe dans lequel on recherche l'acide borique, de l'éthylsulfate de potasse. On chauffe, et les vapeurs qui se dégagent brûlent à la sortie du tube avec une flamme verte qui peut servir à la recherche spectroscopique : sensibilité 1/10 de milligramme.

Velardi (3) critique fortement cette méthode et obtient dans les mêmes conditions une coloration verte avec le chlorure de cuivre ammoniacal, le bichlorure et le carbonate de cuivre. Ce sont des erreurs que peut corriger l'examen spectroscopique.

### B. — Méthode employée au cours du travail

Nous nous sommes arrêtés, M. G. Bertrand et moi, à la méthode suivante pour la recherche de petites quantités d'acide borique.

Tout d'abord, il est absolument nécessaire d'avoir recours à l'entraînement méthylique. Pour mon cas particulier, à savoir recherche dans des cendres végétales, il est impossible d'opérer autrement avec quelque sûreté.

La matière où l'on doit rechercher l'acide borique est calcinée dans une capsule de platine, après évaporation à sec en

1. *B. soc. Chim.*, 3e série, t. XIII, p. 874, 1895.
2. *Rendi compti dei Lincei*, t. XIV, p. 465.
3. *Gazetta chim. Ital.*, 1906, p. 230.

milieu alcalin si nous avons affaire à un liquide (1). La calcination n'est faite qu'à basse température. On reprend le résidu charbonneux par 1 cc. d'acide sulfurique pur et 10 cc. d'alcool méthylique. On verse le tout dans un petit ballon et on distille l'alcool méthylique au bain-marie, sur deux à quatre gouttes d'une solution de soude normale dans une capsule de platine. Lorsqu'il ne passe plus d'alcool, on ajoute au résidu resté dans le ballon 5 cc. d'alcool méthylique et on distille à nouveau. Nous verrons, à propos du dosage de l'acide borique, que dans ces conditions sa totalité est entraînée. On se rend compte par un toucheau sur papier de tournesol que le contenu de la capsule de platine est nettement alcalin. On évapore alors à sec ; il reste au fond de la capsule l'acide borique à l'état de borate de soude et un peu de soude plus ou moins carbonatée. On triture ce résidu avec une goutte ou deux d'acide sulfurique pur et un peu de fluorure de calcium très finement pulvérisé au mortier d'agate, de façon à former une pâte bien homogène et pas trop fluide. En prélevant alors, avec un fil de platine spatulé à l'extrémité, une petite portion de cette masse homogène et en l'approchant lentement d'une flamme de gaz ou d'hydrogène, on obtient, dans la partie extérieure invisible de la flamme, la coloration verte caractéristique et donnant au spectroscope le spectre bien défini.

Nous avions tout d'abord employée la flamme d'un bec Mecker de petite taille. Avec 0 mgr. 004 de bore, c'est-à-dire 0 mgr. 022 d'acide borique, on obtient encore ainsi la flamme verte caractéristique, mais nous sommes à la limite. Des résultats meilleurs ont été obtenus en employant une petite flamme d'hydrogène pur. L'appareil est composé d'un générateur d'hydrogène (appareil continu de Kipp) à partir du zinc et de l'acide sulfurique ; l'hydrogène formé passe dans deux laveurs, le premier contient une solution de permanganate de

1. Dans le cas particulier de recherche dans les tissus végétaux, dont les cendres sont toujours alcalines, il est inutile d'ajouter un alcali pour fixer l'acide borique.

potassium ; le second de l'acide sulfurique pur. Le courant de gaz traverse ensuite un corps de seringue de Pravaz clos à la cire et rempli de ouate pour filtrer les vésicules liquides qui auraient pu être entraînées ; sur le corps de seringue S est adaptée une aiguille de Roux en platine iridié A coupée droite, sans biseau à son extrémité. On allume l'hydrogène au sortir de l'aiguille ; la petite flamme est réglée de façon à avoir une hauteur ne dépassant pas 1 centimètre. C'est de cette petite flamme que nous approchons la boucle de platine chargée du mélange à examiner ; elle se colore en vert dans le cas de présence du bore et permet facilement l'examen à l'aide d'un petit spectroscope. Il faut approcher très lentement le mélange de la flamme et éviter la coloration jaune du sodium et du calcium qui se produit si l'on a des projections ou si l'on est en pleine flamme. On augmente encore la sensibilité de la méthode en munissant l'appareil d'une petite cheminée C de verre (longueur 50 mm., diamètre 18 mm.), dont la base arrive à 1 ou 2 millimètres au-dessus de l'extrémité supérieure de l'aiguille. Cette petite cheminée canalise autour de la flamme la totalité des vapeurs de fluorure de bore ; sans cet artifice, une partie se diffuserait dans l'atmosphère ambiante.

Dans ces conditions la sensibilité de la méthode va jusqu'au demi-millième de milligramme de bore, quantité absolue, présente sur la boucle de platine portée près de la flamme ; cette quantité permet nettement la vision rapide du spectre de l'acide borique au spectroscope (petit spectroscope à vision directe de Zeiss). La flamme verte est encore nette avec le quart de millième de milligramme, mais elle est alors trop fugace pour permettre la vérification spectroscopique. Les petites quantités dont nous parlons sont mesurées en prélevant sur des solutions de dilution connue une goutte avec une pipette donnant un nombre de gouttes connu par centimètre cube. Il est nécessaire pour voir le verdissement de la flamme pour d'aussi faibles quantités de travailler en chambre noire et de faire l'obscurité lorsque la substance est approchée du bec d'hydrogène. On guide le fil de platine en engageant la

baguette de verre qui le porte sur une glissière orientée vers la flamme.

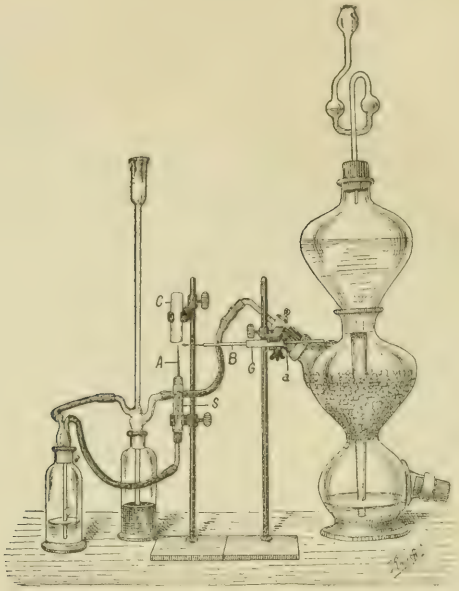



Fig. 1. — Appareil pour la recherche du bore par la flamme d'hydrogène.

Les réactifs à employer pour ce genre de recherches très précises et d'une extrême sensibilité doivent nécessairement être eux-mêmes exempts de toute trace d'acide borique, et ce n'est pas le cas des réactifs commerciaux. Georges (1) faisait déjà remarquer en 1896 au moment de la polémique entre MM. Jay et Villiers sur la présence normale de l'acide borique dans les vins, que les soudes et potasses caustiques du commerce, même purifiées, contenaient des traces appréciables de ce composé. Nous avons donc cherché à préparer des réactifs nous permettant d'avoir des essais témoins négatifs. Nous y sommes parvenus en ce qui concerne la soude en préparant celle-ci directement à partir du sodium métallique et d'eau distillée dans un appareil de verre. Les alcools méthyli-

1. *Journal de chim. et de pharm.*, VI, t. III, p. 346.

que et éthylique tels que les livre le commerce renferment aussi des traces d'acide borique susceptibles de donner la réaction du curcuma dans les conditions très précises où nous l'employons et que nous décrirons plus loin. Il est assez difficile de les en débarrasser. Nous y sommes parvenus après divers tâtonnements en maintenant pendant une heure à l'ébullition l'alcool méthylique à 98°5 de la maison Poulenc sur de petits morceaux de sodium. On distille ensuite l'alcool à la colonne. L'acide sulfurique en contient parfois aussi. On le purifie en le concentrant à feu nu aux deux tiers de son volume primitif. L'acide chlorhydrique pur est exempt d'acide borique. C'est de réactifs ainsi contrôlés et purifiés que nous nous sommes servis au cours de nos recherches, et d'ailleurs nous avons toujours fait l'essai témoin dans les mêmes conditions expérimentales, essai qui nous prouvait par sa négativité vis-à-vis des réactions de l'acide borique la pureté de nos réactifs.

Voyons maintenant ce qu'on peut faire de la méthode de recherche au papier de curcuma, méthode à la fois très prônée et très décriée.

## § IV. — Méthode de recherche au papier de curcuma

### A. — Historique

La découverte de l'action de l'acide borique sur le papier de curcuma est ordinairement attribuée à H. Rose. Pour être juste il faut enlever à ce savant le mérite de la priorité. Le mémoire dans lequel il décrit la réaction date de 1857 (1). Dans la traduction française de la quatrième édition de sa *Chimie analytique* (1843), il signale seulement la teinte brune que prend le papier de curcuma trempé dans une solution d'acide borique ou d'alcalis. C'est donc postérieurement à cette date qu'il découvrit la coloration rouge du papier en

1. *Poggend. Annal.*, t. CII, p. 545, 1857.

présence d'acide borique et d'un acide fort, coloration qu'il décrit fort bien dans son traité de 1859. Or, en 1821, trente-six ans avant la première publication de Rose, un pharmacien de Besançon du nom de Desfosses publiait dans les *Annales de chimie et de physique* un mémoire sur l' « Action du gaz acide fluoborique sur l'alcool » (1) vers la fin duquel on peut lire :

« Je dois aussi faire mention d'une propriété nouvelle que « le hasard m'a fait découvrir dans l'acide borique. Voulant « essayer si le fluoborate de chaux que j'avais obtenu était « acide ou alcalin, je trempai dans sa dissolution un papier « de curcuma qui devint rouge au bout de quelque temps. « La saveur de la liqueur m'ayant paru néanmoins acide, j'y « plongeai un papier de tournesol ; il fut sur-le-champ rougi ; « de sorte que des papiers de l'une ou de l'autre couleur, « mis ensemble dans ce liquide, prirent une nuance rouge « très intense.

« Très étonné de trouver un sel qui jouissait de propriétés « aussi incompatibles, j'essayai de ramener mes papiers à « leur couleur primitive, et je vis que le curcuma, qui avait « été rougi par le fluoborate acide, conservait sa teinte avec « les acides, et que les alcalis lui donnaient une couleur « bleue qui devenait rouge par les acides. Je fis plusieurs ten- « tatives pour savoir quel était le corps qui produisait cette « altération, et je reconnus enfin que *l'acide borique, qui, bien « pur, est sans action sur le papier de curcuma, acquiert, par « son mélange avec les acides minéraux, la propriété de conver- « tir sa couleur jaune en une teinte orange, qui passe au rouge « vif par un excès d'acide, et devient bleu par les alcalis* » (2). « Cet effet est même si tranché, qu'il suffit d'ajouter quelques « gouttes d'une dissolution d'acide borique pur à 20 grammes

1. « Expériences sur l'action du gaz acide fluoborique sur l'alcool ». *Annales de Chimie et de Physique*, t. XVI, p. 72, 1821. Le nom de l'auteur du mémoire ayant été omis lors de la publication, il est donné en note, p. 443 du même tome.

2. Je souligne intentionnellement ce passage caractéristique de Desfosses.

« d'eau aiguisée d'un acide minéral, pour faire prendre, après « quelques instants de contact, au papier de curcuma ces « nouvelles nuances . . . . . .

« Peut-être pourrait-on, dans certaines analyses, se servir « de ce changement pour reconnaître de très petites quan- « tités d'acide borique ? »

Toute la réaction se trouve là, merveilleusement bien décrite. Le mémoire est passé inaperçu : Berzélius (1) ne signale en 1830 que la teinte brune du papier de curcuma trempé dans les solutions d'acide borique pur, puis desséché. Nous avons dit que l'édition française de la *Chimie analytique* de Rose (1843), ne donne que le précédent caractère. Il faut attendre la note de 1857 et le traité de 1859 (2) pour trouver une description détaillée de la réaction. La notion nouvelle qu'apporte Rose sur ce qu'avait écrit Desfosses est celle de la dessiccation à 100° du papier de curcuma trempé dans les solutions d'acide borique additionnées d'un acide minéral. Il donne comme acides forts très favorables les acides chlorhydrique, nitrique, tartrique et surtout sulfurique. Nous aurons quelques réserves à faire à ce sujet. « Les acides faibles », dit-il, « comme l'acide acétique, donnent moins bien la réaction ». Comme corps pouvant donner des colorations qu'on peut confondre avec celle de l'acide borique, il indique la zircone, les acides titanique, tantalique et du niobium. Schlumberger (3) en 1866, puis Daube (4) en 1870, étudient la réaction de l'acide borique sur la curcumine. Le premier propose pour la matière colorante rouge formée le nom de rosocyanine ; c'est un corps à caractère acide; ses sels alcalins et ammoniacaux sont bleus, et c'est là l'explication du virage au bleu du papier rougi par l'acide borique en présence d'un acide fort quand on le traite par la soude ou l'ammoniaque.

1. *Traité de Chimie*, traduction Esslinger, Paris, 1830, t. II.
2. *Traité complet de Chimie analytique.* — V. Masson, Paris, 1859, p. 653.
3. *B. soc. chim.*, t. V, p. 194, 1866.
4. *B. der. D. chem. Gess.*, t. III, p. 609, 1870.

La méthode du papier de curcuma passée dans l'usage général, depuis Rose, a servi de base à de nombreuses recherches d'acide borique. Dieulafait critique sa sensibilité et la juge inapplicable pour le genre de recherches qui l'occupaient. Cet auteur ne séparait pas, en effet, l'acide borique, par un entraînement quelconque, des milieux salins où il le recherchait; il opérait dans une liqueur saturée de chlorure de sodium, et nous verrons que dans de telles conditions la sensibilité de la méthode se trouve extrêmement affaiblie.

Cassal et Gerrans (1) en 1902 proposent l'usage de l'acide oxalique, au lieu de l'acide chlorhydrique généralement employé, comme acide fort pour sensibiliser l'acide borique vis-à-vis du curcuma. Mezger (2) puis Fandler, Wolfram, Jorgensen (3) emploient la réaction du curcuma sans y apporter d'importante modification pour la recherche de l'acide borique dans les matières alimentaires. Goshe (4) regarde la dessiccation comme inutile, revenant ainsi au procédé de Desfosses, et déclare même qu'il obtient de la sorte une plus grande sensibilité de la méthode. Velardi (5) déclare déceler le 1/10 de milligramme de borate avec la méthode au curcuma par dessiccation à 100°.

Cribb et Arnaud (6) préparent un papier avec la teinture de curcuma additionnée d'acide tartrique. Ils ont ainsi un papier très sensible quand il est de préparation récente, donnant la coloration rouge rosé dans une solution d'acide borique à 2 gr. 5 pour 100 litres d'eau, c'est-à-dire 0 gr. 025 par litre (7).

1. *British food Journ.*, p. 210, 1902.
2. *Zeitsch. f. Unters. der Nahr. und genuss.*, t. X, p. 243, 1905.
3. *Zeitsch. f. Unters. der Nahr. und genuss.*, t. II, pp. 137 et 155, 1906.
4. *Zeitsch. f. Unters. der Nahr. und genuss.*, t. X, p. 242, 1905.
5. *Gazetta. chim. Ital.*, 1906, p. 230.
6. *The analyst*, t. XXXI, p. 147, 1906.
7. M. L. Robin (*C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXXVIII, p. 1046, 1904) a proposé pour la recherche de l'acide borique l'emploi de la teinture de fleurs de mimosa. Le papier, préparé à cette teinture, se colore en jaune par les solutions d'acide borique après dessiccation au bain-marie, coloration qui vire

Nous avons repris, M. G. Bertrand et moi la méthode générale en cherchant les conditions d'une grande sensibilité, et l'application à la recherche dans un mélange où une trace d'acide borique est disséminée dans une grande masse d'autres corps.

### B. — Nouvelles recherches et méthode employée

*Extraction et concentration préliminaires de l'acide borique.* — Quand on recherche l'acide borique dans des milieux complexes, il est tout d'abord nécessaire de le séparer des sels avec lesquels il se trouve mélangé et de le concentrer s'il est à l'état de traces. On obtient facilement cette séparation et cette concentration en employant la méthode d'entraînement à l'aide de l'alcool méthylique, dans les conditions que nous avons exposées pour la recherche à la flamme d'hydrogène. L'entraînement par l'alcool méthylique a l'avantage de supprimer la présence des corps qui peuvent être des empêchants de la réaction et de ceux qui peuvent donner une coloration analogue avec le curcuma en dehors de la présence d'acide borique. On reçoit donc l'éther méthylborique dans la capsule de platine sur quelques gouttes de soude normale préparée à partir du sodium.

*Recherche par le procédé classique.* — Après évaporation de l'alcool méthylique au bain-marie, on acidule franchement le résidu à l'acide chlorhydrique, on étend à 1 cc. environ avec de l'eau distillée, et on trempe dans la solution ainsi obtenue le papier de curcuma pendant quelques instants. On le sèche à l'étuve à 100°. La coloration rouge orangé se produit dans le cas de présence d'acide borique dans le liquide primitif. Ces conditions de dessiccation à 100° après immersion du papier dans la liqueur sont celles ordinairement employées.

au rouge brique par le carbonate de soude. Il déclare déceler ainsi 3 milligrammes de borax ajoutés à 10 cc. de vin. Cela ne donne pas une idée bien grande de la sensibilité de cette méthode.

Ce n'est pas la méthode à laquelle nous nous arrêterons. Voyons cependant jusqu'où peut aller sa sensibilité.

*Limites de la réaction classique.* — En trempant le papier de curcuma dans la solution boriquée additionnée d'environ 20 cc. d'acide chlorhydrique pur du commerce par litre, la limite est atteinte avec les solutions contenant 0 gr. 1 d'acide borique par litre. Le virage de la teinte rouge brique obtenue sur les bords seulement du papier au bleu par l'ammoniaque ou le carbonate de soude n'est déjà plus net. Il l'est encore avec une solution à 0 gr. 25 par litre. On pourra donc de cette façon, après avoir amené l'acide borique à chercher dans le volume de 1 cc., déceler 2,5 dixièmes de milligramme.

Nous avons été amenés par la suite à étudier une autre manière d'obtenir la réaction qui nous a présenté une sensibilité beaucoup plus grande, égale en quelque sorte à celle de la méthode de la flamme d'hydrogène.

*Principes de la nouvelle méthode.* — Desfosses, dans l'exposé de sa réaction, ne parle nullement de dessiccation. Goshe s'en est récemment abstenu. Etant donnés la volatilité de l'acide borique et son entraînement par la vapeur d'eau lorsqu'on concentre à 100° ses solutions aqueuses, il est à prévoir, et nos expériences l'ont démontré, que la dessiccation est un obstacle à la sensibilité de la méthode. Comme d'ailleurs la réaction s'effectue très bien à la température ordinaire, nous avons abandonné définitivement l'emploi de la chaleur.

D'autre part, nous avons augmenté la sensibilité de la réaction en concentrant par un artifice particulier l'acide borique sur le papier de curcuma. Si, dans un liquide contenant en solution un corps solide quelconque, on trempe une bande de papier absorbant (papier à filtrer ou buvard) en laissant une portion de la bande en dehors du liquide, ce dernier monte peu à peu dans le papier jusqu'à son extrémité ; l'évaporation se fait rapidement, la surface offerte étant relativement considérable par rapport à la faible masse de liquide qui l'imbibe. Le phénomène se poursuit jusqu'à ce que la totalité de la solution soit évaporée sur la partie exposée à l'air ; la subs-

tance soluble se concentrera donc à l'extrémité de la bandelette, y cristallisera même si elle est en suffisamment grande quantité. C'est de ce principe que nous allons nous servir pour concentrer à l'extrémité d'une bandelette de papier au curcuma de petites quantités d'acide borique, et c'est à l'extrémité du papier que nous verrons se produire la réaction colorée.

*Préparation du papier de curcuma.* — Il est nécessaire tout d'abord d'avoir un papier de curcuma particulièrement sensible. On prépare une teinture par macération à froid pendant 12 heures de racine de curcuma dans l'alcool à 60°. On imprègne, en le trempant dans la teinture obtenue, du papier à filtrer ordinaire ; le papier, après avoir passé dans la teinture, est lavé rapidement dans l'alcool à 96° et séché. On a ainsi un papier de teinte jaune très clair (1) ; c'est celui qui nous a donné les meilleurs résultats. On le découpe en bandelettes de 3 millimètres de large sur 35 millimètres de longueur. On le conserve à l'abri de la lumière.

*Technique de la recherche.* — Dans une petite capsule de porcelaine à fond plat, de 3 centimètres environ de diamètre et de 1 cm. 5 de hauteur, on verse la solution, dans laquelle on doit rechercher l'acide borique, ramenée à environ 1 cc. de la façon que j'ai dit plus haut. On neutralise par l'acide chlorhydrique si l'on est en présence du liquide alcalin provenant de l'évaporation du distillat méthylique en présence de soude dans le cas de recherche dans un mélange complexe, et on ajoute une goutte d'acide chlorhydrique pur du commerce en excès. On appuie sur le fond de la capsule l'extrémité d'une bandelette de papier de curcuma ; la bandelette se colle d'elle-même le long de la paroi, et on fait sortir l'extrémité libre par le petit bec, un centimètre de bandelette environ sort libre au dehors de la capsule. On recouvre alors celle ci d'un petit verre de montre et on abandonne le tout à

1. Couleur orangé jaune n° 181 ou 186 du *Code des Couleurs* de Klincksieck et Valette. — P. Klincksieck, éditeur, Paris, 1908.

l'air. Après quelques heures, le temps varie avec la quantité d'acide borique présent dans la solution, l'extrémité du papier devient rouge orangé. On enlève le papier et en le trempant dans une solution d'ammoniaque au 1/10e, la partie colorée en rouge passe au bleu violacé. S'il n'y a pas d'acide borique dans l'essai, le papier ne change pas de teinte, tout au plus devient-il brunâtre à l'extrémité sous l'action de l'acide chlorhydrique, mais cette teinte brunâtre ne vire pas au bleu par les alcalis et n'a rien en elle-même qui puisse la faire confondre avec la belle teinte rouge orangé très vive que donne l'acide borique. Dans le cas de présence d'acide borique, la coloration est toujours pleinement apparue après 24 heures. C'est le temps que nous choisissons d'ordinaire pour arrêter l'expérience.

L'emploi de l'entraînement méthylique et la présence d'un témoin fait dans les mêmes conditions et avec les mêmes réactifs en même quantité met à l'abri des erreur.

*Limite de sensibilité.* — En présence d'acide borique pur en solution dans l'eau distillée et d'acide chlorhydrique à raison d'une goutte d'acide pur commercial (1) pour 1 cc. de liquide (eau distillée tenant l'acide borique en solution), la quantité absolue de 1/2.000e de milligramme de bore donne, après 24 heures, *une très belle coloration rouge* de l'extrémité du papier, avec le *virage net au bleu* par l'ammoniaque. Voir la quantité absolue de 1/2.000e de milligramme de bore dissoute dans 1 cc. d'eau, c'est déceler l'acide borique dans une solution contenant 0 mgr. 5 de bore, 2 mgr. 8 d'acide borique par litre. Notre sensibilité est dix fois plus grande que celle atteinte par la méthode de Cribb et Arnaud.

1. Nous avons employé comme compte-gouttes une petite pipette donnant 45 gouttes d'eau distillée au centimètre cube. Les faibles quantités de bore dont nous parlons sont prélevées avec cette pipette sur une solution dont une goutte contient 1/2.000e de milligramme de bore ; c'est cette solution qu'on dilue pour les quantités moindres, et dont on verse plusieurs gouttes pour les quantités supérieures. La solution contient donc 22 mgr. 5 de bore au litre, c'est-à-dire, 0 gr. 127 d'acide borique.

Avec des quantités inférieures, le virage au bleu par l'ammoniaque devient indécis, mais la coloration rouge orangé est encore nette pour 1/5.000e de milligramme de bore. Elle est encore visible, surtout par comparaison avec un témoin sans bore pour le 1/20.000e et même le 1/50.000e. Le 1/100.000e de milligramme ne présente pas trace de différence avec le témoin. La limite inférieure de la teinte rouge orangé est donc le 1/50.000e de milligramme de bore. Je ne crois pas qu'aucune méthode chimique ait déjà pu atteindre une telle sensibilité (1).

Sans aller si loin, on peut affirmer déceler avec certitude dans une solution ne contenant que de l'acide borique et de l'acide chlorhydrique le demi-millième de milligramme de bore en solution dans 1 cc. de liquide ; avec cette dose on obtient le virage au bleu par l'ammoniaque bien caractéristique.

*Action de la quantité d'acide chlorhydrique.* — Nous avons essayé en présence de cette même quantité d'acide borique des quantités croissantes d'acide chlorhydrique. La dose la plus favorable est une goutte d'acide commercial pur, Au-dessous de cette dose, la sensibilité paraît un peu affaiblie. Au-dessus elle n'est pas augmentée et pour des doses très fortes, l'acide attaque l'extrémité du papier. Il n'y a donc pas avantage dans les solutions pures à employer un excès d'acide chlorhydrique. Nous verrons qu'il n'en est plus de même en présence de grandes quantités de chlorures alcalins.

*Emploi des divers acides.* — Rose donne comme acides minéraux forts susceptibles de sensibiliser l'acide borique vis-à-vis du curcuma les acides chlorhydrique, nitrique et sulfurique. L'acide borique seul ne nous a donné après 24 heures, même à la dose de 1/100e de milligramme dans 1 cc. d'eau aucune coloration à l'extrémité du papier. Nous venons de voir quelle est, en présence d'acide chlorhydrique,

1. La recherche de l'arsenic par la méthode de G. Bertrand permet de déceler 1/2 millième de milligramme d'arsenic.

la sensibilité de la réaction. L'acide sulfurique (1 goutte à 50 o/o en volume dans 1 cc de liquide) donne des résultats de même ordre, mais il présente pour nous l'inconvénient de donner seul, après 24 heures, une légère teinte rouge à la pointe du papier ; cette teinte ne vire pas au bleu par l'ammoniaque et ne peut être confondue avec celle d'un témoin boriqué ; cependant la similitude de la première teinte nous a fait rejeter l'emploi de l'acide sulfurique. L'acide azotique ne peut être appliqué aux conditions de notre recherche : seul à raison d'une goutte d'acide pur du commerce par centimètre cube, il décolore le papier de curcuma, et en présence de 1/1.000e de bore, aucune coloration rouge n'apparaît après 24 heures. Les acide acétique et oxalique agissent de même. L'acide chlorhydrique est en somme le seul pratique.

*Action empêchante des sels.* — La production de la coloration du papier pour de faibles doses d'acide borique peut être empêchée par la présence dans la solution de sels minéraux ou organiques.

Nous avons recherché l'influence empêchante de divers sels en essayant de déceler le bore dans leurs solutions normales, une molécule-gramme par litre.

Les fluorures, les iodures, les formiates sont des empêchants absolus : ils ne permettent la production d'aucune coloration.

Les sulfates et les chlorures sont simplement des atténuants de la sensibilité de la réaction. Comme notre recherche dans les milieux complexes se fera après entraînement sur un alcali à l'état de borate de méthyle, on aura toujours affaire à une recherche en présence de chlorure alcalin. Nous avons donc recherché spécialement quelle est la mesure dans laquelle la présence des chlorures abaisse la sensibilité de la méthode

En présence de 1 cc. de solution normale de *chlorure de potassium* et d'une goutte d'acide chlorhydrique pur, on n'obtient la coloration rouge orangé virant au bleu de façon nette par l'ammoniaque que pour le 1/50e de milligramme de

bore. Avec 5 gouttes d'acide chlorhydrique, pour la même quantité de liquide, on voit le 1/400e de milligramme. Un excès d'HCl augmente la sensibilité en présence d'une forte dose de chlorures.

Le *chlorure de sodium* est moins empêchant que le chlorure de potassium. En présence d'une solution normale de ce chlorure, la coloration est encore nette avec 1 goutte d'HCl, pour 1/350e de milligramme de bore, avec 5 gouttes pour 1/1.000e avec virage au bleu très net.

En réalité nous ne nous trouverons jamais en présence d'une liqueur normale de chlorure de sodium, et il nous sera toujours possible d'opérer avec un excès d'acide chlorhydrique.

Nous avons donc entre les mains deux méthodes d'une sensibilité énorme : la méthode de la flamme avec contrôle du spectroscope et la méthode du papier de curcuma, coloration rouge avec virage au bleu-violet par l'ammoniaque. Nous allons, avec sûreté, pouvoir aborder la question de la présence normale de l'acide borique dans le règne végétal.

# CHAPITRE II

## DISSÉMINATION DU BORE DANS LA NATURE

### § I. — Historique

A. *Présence dans les roches, la mer et les eaux minérales naturelles.* — La dissémination de l'acide borique à la surface du globe, en dehors des gisements exploitables ou des dégagements volcaniques a été largement démontrée pendant la seconde moitié du XIXe siècle. Dès 1823, Ed. Turner (1) décèle l'acide borique par la méthode du fluorure de bore, dans les tourmalines, et l'axinite du Dauphiné, de Cornwall et du Massachusets.

H. Rose, par la réaction du curcuma en trouve dans les eaux minérales d'Aix en Savoie, Bouis (2) dans celles d'Olette (Pyrénées), Filhol (3) dans celles de Luchon, Barèges, Cauterets, Bonnes et Labanère. Veatch (4) constate la présence d'acide borique dans les eaux des sources minérales de Californie ; en ayant trouvé dans le sel marin du marché de San-Francisco, il eut l'idée de le rechercher dans l'eau de mer de la côte aux environs de cette ville ; ses résultats furent positifs ; mais il n'en trouva plus dans l'eau de mer prélevée loin de cette partie de la côte ; il en conclut à un

1. *Loc. cit.*
2. *C. R. Ac. d. Sc.*, t. XXXVI, p. 229, 1855.
3. *C. R. Ac. d. Sc.*, t. XXXVI, p. 337, 1855.
4. *Chem. News*, t. IV, p. 16, juillet 1861.

phénomène local, dû à l'abondance de l'acide borique dans le sol et les eaux de la Californie.

Forshammer (1) ne parvient pas, après avoir signalé sa présence dans les cendres de Fucus, à en démontrer l'existence dans l'eau de la mer ; il employait comme procédés de recherche la flamme de l'alcool et le curcuma. En 1867, Nœllner (2), armé sans doute d'une technique plus sensible, signale la présence de traces d'acide borique dans l'eau de mer.

Nous arrivons à l'important travail de Dieulafait (3). A l'aide des méthodes que nous avons décrites plus haut, il a démontré la présence d'acide borique dans l'eau des mers actuelles, dans celle des lacs salés de la période moderne, dans les eaux de la mer Morte, dans de nombreuses eaux minérales naturelles (Contréxéville, Schinzbach, Montecatini), dans les salpêtres naturels du Chili et du Pérou. Il arrive aux conclusions suivantes : « L'acide borique des terrains sédimentaires a pour origine unique et exclusive l'évaporation des eaux des mers des époques correspondantes. Il se concentre surtout dans les dernières eaux-mères.... Toute source minérale ou émanation quelconque, sortant des terrains sédimentaires, qui donnera à l'analyse des quantités notables de chlorure de potassium et de chlorure de magnésium devra renfermer de l'acide borique ». On rencontre en effet l'acide borique à l'état de borate de magnésie et dans les conditions prévues par Dieulafait à Stassfurth ; l'origine de ce gisement est démontrée marine d'après la place même occupée par les différents sels. L'apport à la surface du sol de l'acide borique par les déjections volcaniques et les eaux minérales est dû à des réactions complexes sur les dépôts marins souterrains. La quantité de bore est au minimum dans l'eau de la Méditerranéede 0 gr. 02 par mètre cube.

Les travaux des auteurs postérieurs à Dieulafait ou con-

1. *Ph. Trans. Roy. Soc.*, 155, 203, 1865.
2. *J. f. prak. Chem.*, t. CII, p. 463, 1867.
3. *Loc. cit.*, *C. R. Ac. des Sc.*, t. XCIII, p. 222 ; t. XCIV, p. 1352 ; t. XCV, p. 999 ; t. XCVIII, p. 1545 ; t. C, p. 1017 ; t. C. p. 1240.

temporains ne font que compléter la démonstration de l'origine marine des gisements d'acide borique et par suite de sa présence à l'état de traces dans tous les terrains sédimentaires. Durwell (1) en trouve dans les lacs salés de l'Algérie et les sédiments provenant de l'évaporation des mers anciennes ; Carnot (2) dans les eaux de Royat ; Richard (3) dans les dépôts schisteux des Ardennes.

Parmentier (4) par le spectroscope constate la présence d'acide borique dans la plupart des eaux minérales du centre. Il dose même les quantités qu'elles en contiennent. A Royat, selon les sources, la teneur varie entre 0 gr. 0018 et 0 gr. 0038 d'acide borique par litre d'eau. Jay et Dupasquier en trouvent jusque dans l'eau de l'Ourcq (0 gr. 00012 par litre). Moureu et A. Gautier (5) en signalent de grandes quantités dans les eaux artésiennes du parc d'Ostende.

De l'ensemble de ces travaux, il ressort que l'acide borique est présent à l'état de traces un peu partout ; les sédiments marins en renferment et, par là même, toute la surface du globe cultivée ; le ravinement par les eaux se charge du transport de l'acide borique comme il le fait pour les autres éléments. *A priori* on peut supposer que les plantes en absorbent de petites quantités.

B. *Présence dans les produits végétaux.* — La première publication que j'ai trouvée, relative à la présence de bore chez les végétaux, est dû à Wittstein et F. Apoiger (6) en 1857. Les deux auteurs isolent de l'acide borique des graines de Saoria (*Maesa picta*), primulacée de l'Abyssinie et le reconnaissent par les réactions du curcuma et de la flamme de l'al-

1. *B. soc. chim.*, t. XXIX, p 481, 1878.
2. *B. soc. chim.*, t. XXXII, p. 114, 1879.
3. *B. soc. chim.*, t XXXII, p. 114, 1879.
4. *C. R. Ac. des Sc.* t. CXIII, p. 41, 1891.
5. *J. de pharm. et de chim.*, t. XXVII, p. 189, 1908.
6. *Entdenckung der Borsaüre im Pflanzenreiche.* Ann. Chem. Pharm. Lieb., t. CIII, p. 362, 1857.

cool. En 1879, Bechi (1) signale sa présence dans les végétaux des terrains boracifères. Il en trouve jusqu'à 1/30.000e du poids des cendres pour un hêtre de Toscane. Crampton (2) le décèle dans un grand nombre de vins de Californie et en attribue d'abord l'existence à une addition frauduleuse de la part des fabricants ; mais peu après Baumert (3) à l'aide de la méthode du papier de curcuma en trouve dans un grand nombre de vins naturels et dans toutes les parties du ceps de vigne ; il en déduit que l'acide borique, normal dans les produits de la vigne, n'est pas caractéristique du vin de certaines localités et ne provient pas d'addition frauduleuse. Les résultats sont confirmés par ceux de Soltsien (4), de Ripper (5) et de Rising (6). Crampton reprend alors ses recherches, et, abandonnant son idée primitive d'une addition frauduleuse, il trouve de l'acide borique dans presque tous les vins des Etats-Unis; il étend ses recherches dans le règne végétal et en trouve dans le pêcher, le melon d'eau; avec la canne à sucre, les betteraves, les pommes et le cidre, ses résultats sont négatifs (7). E. O. von Lippmann (8) avait cependant trouvé l'année précédente de petites quantités d'acide borique dans les cendres de betterave. Passerini (9), en 1893, dans une série de travaux, insiste sur la présence de l'acide borique dans certains végétaux. K. Schmitt (10) en signale à nouveau la présence dans les vins. La question particulière de l'existence normale du bore dans les vins paraissait bien réglée, lorsque, en 1895, Villiers et Fayolle, ayant perfectionné la méthode de la

1. *Acc. dei Lincei*, 15 juin 1879.
2. *J. dep. of. Agric., Chem. Div.*, Bulletin 13, 3e partie.
3. *B. Deutch. chem. Gesell.*, t. XXI, p. 3290, 1888.
4. *Pharm. Zeitsch.*, t. XXXIII, p. 312.
5. *Weinbau und Weinhandel*, no 36, 1888, ou *Zeitsch. angew. Chem.*, 1888, p. 623.
6. *J. dep. of. Agric.*, Bulletin 19, p. 38.
7. *B. Deutch. chem. Gesell.*, t. XXII, p. 1072, 1889.
8. *B. Deutch. chem. Gesell.*, t. XXI, p. 3492, 1888.
9. *Staz. Sper. Agrar.*, t. XX, p. 471; t. XXI, p. 20 et 565.
10. *Chem. centralb.*, 1892, b, p. 1009.

recherche par la flamme de l'alcool en présence d'acide sulfurique (1), furent amenés à la nier. La même année cependant, Jay et Dupasquier (2) trouvaient et dosaient l'acide borique dans des vins de Bourgogne, de Bordeaux, de l'Aude et de l'Hérault et dans des cidres préparés dans leur laboratoire. Jay publiait seul peu après (3) toute une série de dosages d'acide borique dans des vins d'origine variée, des marcs de raisin, des fruits divers, des légumes, et de nombreux végétaux comestibles ou non. Il insiste dans son travail sur la nécessité de séparer l'acide borique des différents sels pour faire l'essai à la flamme ou au chalumeau, mais il ne décrit pas en détail les méthodes de recherche qu'il a employé; Villiers en profite pour déclarer que les chiffres trouvés par Jay dans ses dosages sont impossibles, la méthode de recherches qu'il a employé avec Fayolle se trouvant sensible bien au-dessous de ceux-ci, et il affirme à nouveau l'inexistence du bore dans les vins naturels non sophistiqués (4). Ce qui n'empêche pas Azarelli (5) d'en trouver dans les vins de Sicile et de l'y doser sur 84 échantillons. Lippmann (6) en 1902, décèle, comme Jay l'avait fait, de l'acide borique dans les citrons, les oranges, le houblon.

Mes recherches vont confirmer la présence de bore normal dans les végétaux; je les étendrai autant que possible à des groupes végétaux et à des portions du végétal non étudiées jusqu'ici à ce point de vue.

### § II. — Recherches personnelles.

*Existence dans le vin.* — J'ai recherché l'acide borique dans des vins naturels que je puis affirmer exempts de toute

1. *Loc. cit.*
2. *B. soc. chim.*, 3e série, t. XIII, p. 877, 1895.
3. *B. soc. chim.*, 3e série, t. XV, p. 33, 1896.
4. *B. soc. chim.*, 3e série, t. XV, p. 548, 1896.
5. *Gazetta chim. Ital.*, t. XXXVI, II, 1906, p. 575.
6. *Pharmac. Zeitsch.*, 1902.

addition de produit chimique. Ce sont des vins blancs et rouges provenant du département de la Corse. J'ai pu, sur quatre échantillons de ces vins, un blanc et trois rouges, déceler à plusieurs reprises la présence d'acide borique. 5 cc. de vin sont évaporés à sec au bain-marie après neutralisation avec de la soude préparée exempte de bore ; le résidu est calciné, et repris par 1 cc. d'acide sulfurique pur et 10 cc. d'alcool méthylique. On distille sur 4 gouttes de soude normale, on reprend le résidu resté dans le ballon par 5 cc. d'alcool méthylique et on distille à nouveau. On évapore à sec l'alcool méthylique distillé sur la soude. On divise le résidu obtenu en deux portions ; sur l'une on peut faire la réaction du curcuma après avoir acidulé à l'acide chlorhydrique de la façon qui a été indiquée plus haut. Sur l'autre, qu'on mélange à du fluorure de calcium et de l'acide sulfurique, on fait la recherche à la flamme et au spectroscope. J'ai toujours pu, pour mes échantillons de vin, obtenir les deux réactions : coloration rouge du papier de curcuma virant au bleu par l'ammoniaque ; coloration verte de la flamme d'hydrogène donnant les raies caractéristiques du spectre de l'acide borique.

Pour toutes les recherches dont je parle on emploie des réactifs purifiés spécialement comme il a été dit et un témoin est fait chaque fois dans les conditions de la recherche.

*Existence dans les alcools méthylique et éthylique.* — J'ai dit à propos de la préparation des réactifs servant aux recherches que ces deux alcools renfermaient de faibles traces d'acide borique susceptibles de donner le curcuma. La volatilité des éthers boriques et la préparation de ces alcools à partir de produits végétaux expliquent qu'ils puissent contenir du bore.

*Existence dans le tabac.* — Le tabac est très riche en acide borique ; avec les cendres d'une seule cigarette (poids 0 gr. 9) de tabac de la régie française (Maryland), j'ai pu obtenir par la même méthode que pour les vins les deux réactions complètes.

*Existence dans des cendres végétales variées.* — J'ai recherché l'acide borique dans une série de cendres végétales obtenues en calcinant au moufle des végétaux bien lavés au préalable extérieurement à l'eau distillée pour éliminer les parties terreuses qui pourraient y être fixées ; ce sont ces cendres qui m'ont servi à faire les dosages qui sont exposés plus loin.

0 gr. 5 de cendres sont traités par 2 cc. d'acide sulfurique et 10, puis 5 cc. d'alcool méthylique. On distille comme je l'ai exposé pour les cendres de vin, sur 0 cc. 4 de soude normale. On évapore à sec le distillat. On reprend le résidu par 3 gouttes d'acide chlorhydrique pur et on installe avec un papier de curcuma dans la petite capsule, suivant la méthode décrite, après avoir étendu à 1 cc.

On laisse 18 heures au contact. Voici en tableau les résultats obtenus :

| | Longueur de la bande colorée en rouge et virant au bleu par l'ammoniaque après 18 heures |
|---|---|
| Essai témoin . . . . . | 0 |
| Témoin + 0 mgr. 0005 Bo . . . . . | 4 mm. |
| 0 gr. 5 cendre de luzerne . . . . . | 14 — |
| — feuilles de *Robinia pseudo-acacia* L. . . . . | 16 — |
| — feuilles de chêne . . . . | 15 — |
| — feuilles de charme . . . | 11 — |
| — feuilles de figuier . . . . | 16 — |
| — écorce de bouleau . . . . | 13 — |
| — tige de vigne. . . . . | 13 — |
| — tige et feuilles de *Larix Europea* . . . . . | 8 — |
| — feuilles de *Pinus Strobus* L. | 14 — |
| — *Pteris Aquilina L.* (frondes). | 16 — |
| — *Laminaria saccharina* Lam . | 16 — |
| — Champignon de couche . . | 13 — |

Plusieurs papiers peuvent être installés successivement dans la même capsule et donnent de nouveau la réaction. La quantité d'acide borique est telle, que je n'ai pas eu besoin pour obtenir, avec les 12 échantillons ci-dessus la réaction de la flamme et du spectroscope, de former le fluorure de bore. Dans le résidu chlorhydrique contenu dans la capsule après obtention de la réaction du curcuma, on trempe le fil de platine, et en l'approchant de la petite flamme d'hydrogène on obtient la coloration verte ; les bandes caractéristiques de l'acide borique peuvent être facilement aperçues au spectroscope.

La quantité d'acide borique contenue dans les cendres de Fucus et de Laminaire permet de faire directement sur les cendres, sans passer par l'entraînement méthylique, la réaction du curcuma, malgré la masse de sels empêchants qu'elles contiennent : une pincée de cendres est acidulée par l'acide chlorhydrique dans la petite capsule avec 1 cc. d'eau. Au bout de 18 heures le papier est rougi sur 15 millimètres de longueur. Pour obtenir avec ces mêmes cendres la flamme verte à l'hydrogène, il suffit de les humecter directement avec de l'acide sulfurique, d'y ajouter le fluorure de calcium pulvérisé et d'approcher de la flamme une boucle de platine chargée de ce mélange.

Après ces recherches, auxquelles je crois avoir apporté la plus grande précision désirable, et celles de mes prédécesseurs, la présence normale de l'acide borique dans le règne végétal ne paraît laisser aucun doute. Nous allons maintenant chercher à nous rendre compte des quantités présentes.

# CHAPITRE III

## LES MÉTHODES DE DOSAGE DE L'ACIDE BORIQUE

### § I. — Historique

La faiblesse des affinités chimiques de l'acide borique, et le peu de stabilité de ses combinaisons insolubles que l'eau dissocie facilement, ont fait de son dosage une question assez délicate. Son emploi comme antiseptique et comme conservateur des produits alimentaires a donné en ces derniers temps un grand intérêt à l'obtention de dosages précis. Les méthodes proposées sont nombreuses et la littérature est sur ce sujet assez complexe.

Je crois que l'exposé historique gagnera en clarté à ne pas être présenté dans l'ordre chronologique pur et simple, mais plutôt en rassemblant par groupes les méthodes proposées d'après leur technique.

J'observerai donc la classification suivante :

A. Méthodes gravimétriques.
- I. Pesée directe
  - 1° en nature.
  - 2° à l'état de combinaison.
- II. Pesée par différence.

B. Méthodes volumétriques.
- I. Dosage direct.
- II. Dosage indirect.

C. Méthodes physiques.

J'étudierai ensuite à part l'historique de la méthode de séparation des milieux complexes à l'état d'éther méthylborique.

## A. Méthodes gravimétriques

I. *Pesée directe.* — 1° *En nature.* — On ne peut pas déterminer la quantité d'acide borique contenue dans une solution de ce corps dans l'eau pure, par simple évaporation au bain-marie et pesée du résidu. L'acide borique est entraîné en quantité notable par la vapeur d'eau, surtout lorsqu'on arrive vers la fin de la concentration. A. Partheil et J. H. Rose (1) ont cependant réussi à opérer un dosage en nature par pesée en se servant de la légère solubilité de l'acide borique dans l'éther saturé d'eau et de cette propriété qu'ont les vapeurs d'éther de ne pas entraîner l'acide borique. Ils épuisent par l'éther la solution aqueuse contenant l'acide borique à doser pendant 18 heures dans un appareil à épuisement particulier. On évapore ensuite l'éther et on sèche le résidu dans le vide sulfurique : on pèse. Outre l'inconvénient résultant de la longueur de l'opération, cette méthode ne peut être employée suivant ses auteurs en présence d'acides sulfurique, phosphorique, azotique ou arsénieux, ni de fortes quantités de chlorure ferrique ou de chlorure de zinc ; à cette liste il faudrait ajouter, comme l'on sait, presque tous les autres acides, minéraux ou organiques.

2° *A l'état de combinaison.* — Berzélius (2), puis Stromeyer (3) ont proposé le dosage à l'état de *fluoborure de potassium.* D'après Stromeyer, on verse dans le liquide de la lessive de potasse de façon à ce qu'il se trouve au moins un équivalent de potasse pour 1 équivalent d'acide borique présumé. On ajoute ensuite un excès d'acide fluorhydrique pur, et on évapore à sec dans une capsule de platine. Le résidu est traité par une solution d'acétate de potasse (1 partie pour 4 parties d'eau); on laisse en contact quelques heures. On filtre sur

1. *B. Deutsch. chem. Gesell*, t. XXXIV, p. 3611, 1901.
2. *Pogg. Ann.*, II.
3. *Ann. Chem. u. Pharm.*, t. C, p. 82.

filtre taré ; on lave avec la solution d'acétate jusqu'à ce que le liquide filtré ne précipite plus par le chlorure de calcium. On lave à l'alcool et on sèche à 100° : on pèse. Cette méthode n'est applicable qu'en présence de sels des métaux alcalins. Elle n'est pas d'une très grande exactitude : Stromeyer dit obtenir entre 97,5 et 100,2 o/o. Carnielli (1), dans une étude critique des méthodes de dosage de l'acide borique, la juge sans valeur, donnant 4 o/o en moins en présence de sels de potasse et de 11 à 14 o/o en plus en présence de sels de soude.

Ditte (2) expose une méthode de dosage à l'état de *borate de calcium cristallisé*. Elle n'a pas, que je sache, été employé après lui par d'autres auteurs.

P. Berg (3) a proposé la forme de *borate de baryum*, obtenu par précipitation de l'acide borique par l'eau de baryte, en évitant l'action de l'acide carbonique de l'air. Cette dernière condition ne paraît pas facile à réaliser pendant toute une opération où il sera nécessaire de filtrer ; de plus, il faut opérer en liqueur concentrée à cause de la solubilité et de la facile dissociation du borate de baryum. R. J. Manning et W. R. Lang (4) ont récemment repris une méthode analogue. Ils entraînent l'acide borique par l'alcool méthylique sur du chlorure de baryum. L'acide chlorhydrique mis en liberté est neutralisé exactement en présence de phtaléine du phénol. Le précipité obtenu en liqueur concentrée est lavé à l'alcool et séché à 110°. On pèse le corps $Ba(BO^2H^2)^2$. On ne peut attendre une grande précision de ces méthodes qui ne donnent de résultat qu'en liqueur concentrée. H. N. Morse et O. W. Horn (5) donnent une méthode qui évite précisément cet inconvénient. Ils amènent l'acide borique en solution aqueuse à l'état de sel de soude et concentrent à 20 cc. Ils neutralisent par l'acide sulfurique en présence d'hélianthine. La masse est alors dessé-

1. *Gazetta chim Ital.*, t. XXXI, p. 544, 1901.
2. *C. R. Ac. des Sc.*, t. LXXX, p. 490, 1875.
3. *Zeitsch. f. anal. chem.*, t. XVI, p. 25.
4. *Journ. chem. soc.*, t. XC, p. 491, 1906.
5. *Ann. Journ.*, t. XXIV, p. 105, 1900.

chée par du sulfate de cuivre anhydre et ils en extraient l'acide borique par l'alcool absolu. On ajoute à l'alcool de la baryte hydratée ; l'excès en est précipité par $CO^2$. On évapore, on sèche, on calcine doucement, on pèse. Connaissant le poids de baryte employé, celui du résidu (carbonate et métaborate de Ba), on déduit le poids d'acide borique. Cleveland Jones (1) a critiqué fortement cette méthode : il déclare qu'on ne peut pas amener par calcination le métaborate de baryum à un état susceptible de pesée constante : l'acide carbonique le décompose en partie.

Mylius et Meussner (2) ont proposé le dosage à l'état de *phosphate de bore* ($PO^4B$). Ce corps préparé par Meyer (3) en évaporant et calcinant des quantités moléculairement équivalentes d'acides phosphorique et borique, prend aussi naissance dans les solutions d'acide phosphorique et métaborique faites dans l'acide sulfurique pur ou l'acide acétique cristallisable. Mais d'après Prescher (4) il attaque les creusets de platine et même ceux de quartz fondu ; c'est là un obstacle sérieux à l'emploi de cette méthode.

II. *Pesée par différence.* — H. Rose (5) ajoute à la solution boriquée un poids connu de carbonate de soude pur et anhydre : une à deux fois la quantité supposée d'acide borique. On évapore à sec, on chauffe à fusion et on pèse. Le résidu contient une quantité connue de soude et une proportion inconnue d'acide carbonique et d'acide borique. On dose l'acide carbonique, et par différence on a le poids d'acide borique.

Une autre méthode a pour principe de traiter un poids connu de borate ou de substance qui le renferme, après pulvérisation, par un excès d'acide fluorhydrique et d'acide sulfurique. On chauffe, l'acide borique se dégage à l'état de gaz

1. *Zeitsch. anorg. chem.*, t. XXXII, p. 164, 1902.
2. *D. Berich. chem. Gers.*, t. XXXVII, p. 397, 1904.
3. *Berl. Ber.*, t. XXII, II, p. 2919.
4. *Monit. scient de Quesneville*, 1907, t. I, p. 412.
5. *Pogg. Ann.*, t. LXXX, p. 262, 1851.

fluoborique $BFl^3$. Le résidu pesé renferme les bases à l'état de sulfate ; on les dose et par différence on a l'acide borique.

Marignac a employé une méthode applicable seulement en présence d'alcalis ou de magnésie. On transforme le borate ou l'acide borique en borate de magnésie par du chlorure de magnésium. Par chauffage au rouge vif prolongé on décompose le chlorure. On reste en présence d'un mélange de magnésie et de borate de magnésium, qu'on pèse. La magnésie totale est dosée à l'état de phosphate ammoniaco-magnésien, et par différence on a l'acide borique.

Outre les opérations plus ou moins compliquées qu'elles entraînent, ces méthodes s'attirent la critique applicable à toutes les méthodes par différence : la pesée ne s'applique pas directement au corps à doser, et c'est une cause d'erreur supplémentaire, surtout lorsque ce corps n'est pas en grande quantité.

### B. Méthodes volumétriques

I. *Dosage direct.* — Nous avons dit que l'hélianthine n'est pas sensible à l'acidité borique. Le tournesol et la phtaléine ne permettent pas non plus une titration directe : le virage est progressif et ne correspond pas à un point exact de saturation (1). Il faut avoir recours soit à des indicateurs colorés spéciaux, soit à des artifices de dosage particuliers qui rendent l'acidité borique sensible à la phtaléine. Guyard (2) a proposé l'hématoxyline, virant après saturation d'une molécule d'acide borique par une molécule d'alcali. Ce réactif n'a pas, d'après Beermann (3), un virage suffisamment net. Engel (4) préconise l'emploi du bleu C4B Poirrier.

Le fait que l'hélianthine n'est pas virée par l'acide borique permet sa titration directe en présence d'acides minéraux

1. Joly, *loc. cit.*
2. *B. soc. chim.*, 2e série, t. XL, p. 422, 1883.
3. Thèse, Erlangen, 1898.
4. *B soc. chim.*. 2e série, t. XLV, p. 326, 1886.

libres et par suite dans les mélanges minéraux complexes, sauf toutefois ceux contenant des phosphates et des carbonates. En présence d'un premier indicateur virant comme l'hélianthine, on amène le mélange à acidité par addition d'acide chlorhydrique ou sulfurique, c'est-à-dire jusqu'à virage au rose. On revient à neutralité à l'aide de la liqueur alcaline titrée ; à ce moment on n'a pas encore touché à l'acide borique ; il se trouve entièrement libre. On peut le titrer en présence d'un second indicateur qui lui est sensible. Cette méthode dite de la *double titration* est celle qui a été employée par tous les auteurs qui dosent volumétriquement l'acide borique. F. Parmentier (1), en 1891, a ainsi dosé les petites quantités d'acide borique qui se trouvent dans les eaux minérales ; comme premier indicateur, il emploie l'hélianthine ; comme second l'orcéine En 1895, Jay et Dupasquier (2) suivent la saturation de l'acide fort par des touches successives sur papier de tournesol ; ils se servent du bleu C4B Poirrier dans la titration même de l'acide borique. Leur toucheau au tournesol est loin de valoir le virage de l'hélianthine, et en expérimentant leur méthode, je me suis rendu compte personnellement que le virage du bleu C4B n'est pas d'une très grande netteté.

Vers la même époque, l'attention des chercheurs a été appelée sur un fait signalé par Daniel Klein (3) en 1878 : lorsqu'on ajoute à une solution d'acide borique de la mannite ou de la glycérine, ou tout autre alcool polyvalent présentant une fonction alcoolique primaire libre, la réaction acide de la solution devient beaucoup plus franche ; le tournesol est nettement rougi. R. Thomson (4), Barthe (5), puis Jœrgensen (6) appliquent cette propriété au dosage des borates. On sature

1. *Loc. cit.*
2. *C. R. Ac. des Sc.*, 1895, 2e semestre, p. 260.
3. *B. soc. chim.*, t. XXIX, p. 195, 1878.
4. *Journ. soc. chem. Ind.*, t. XII, p. 432, 1893.
5. *Journal de Pharm. et Chim.*, t. XXIX, p. 163, 1894.
6. *Zeitsch. f. Nahrungs. u. gemitt.*, t. IX, p. 389.

exactement l'alcali en présence d'hélianthine avec un acide. Puis, dans le liquide ainsi neutralisé on ajoute 30 o/o de glycérine et quelques gouttes de phtaléine, et on titre à l'aide d'une liqueur alcaline ; le virage au rouge se fait seulement, dans ces conditions, lorsque la quantité de soude versée correspond à la formation du borate $BO^3NaH^2$.

Copaux (1) emploie avec succès la méthode de Thomson et de Barthe. Carnielli lui attribue des résultats variant de 100,1 à 99,98 o/o. Elle apparaît donc comme une bonne méthode volumétrique.

Cleveland Jones (2) lui applique la propriété, signalée par Barthe (3), que présente l'acide borique de ne pas déplacer l'iode d'un mélange d'iodure et d'iodate comme le font les autres acides minéraux. La solution contenant l'acide borique est nettement acidifiée à l'acide chlorhydrique, et on neutralise ce dernier par le mélange d'iodure et d'iodate de potassium. Pour se débarrasser des traces d'acide carbonique qui fausseraient les résultats, on opère en présence de chlorure de baryum. On décolore l'iode par l'hyposulfite au fur et à mesure qu'il précipite ; lorsque l'iode ne précipite plus, tous les acides minéraux sont saturés. Il reste l'acide borique libre : on le titre par une solution de soude en présence de phtaléine et d'une quantité suffisante de mannite. Le procédé permet la neutralisation exacte des acides forts sans toucher à l'acide borique; un petit excès du mélange d'iodure et d'iodate n'importe pas. A. Stock (4) modifie légèrement la méthode de Jones : il insiste sur la nécessité d'opérer en l'absence de l'acide carbonique dans les solutions, nécessité sur laquelle Jay et Dupasquier avaient déjà insisté. Il fait préalablement bouillir tous les réactifs employés ; comme Jones, il préconise l'emploi de la mannite au lieu de la glycérine. J. Wolf (5)

1. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXVII, p. 756, 1898.
2. *Am. J. of. Science*, t. VII, p. 147 *et Zeitsch. f. anorg. Chem.*, t. XX, p. 216, 1898.
3. *Loc. cit.*
4. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXX, p. 516, 1900.
5. *Ann. de chim. et de physique*, 7e série, t. XXI, 1900.

propose comme premier indicateur en remplacement de l'hélianthine dans la méthode de Thomson l'emploi de la coloration donnée par l'acide salycilique en présence de perchlorure de fer. Ces derniers temps, Copaux et Boiteau (1), puis Binet du Jansonneix (2), ont appliqué à leurs recherches la méthode de Jones. Ils reviennent à l'emploi de la glycérine, la mannite présentant certains inconvénients pour leur cas particulier.

II. *Dosage indirect.* — Ed. Smith (3) traite la solution de borax par un volume connu d'une solution titrée de sulfate de manganèse additionné d'un volume égal d'alcool. La totalité de l'acide borique est ainsi précipitée à l'état de sel de manganèse. On filtre, on enlève du filtrat l'alcool par évaporation et, par une solution titrée de permanganate de potassium, on titre le manganèse restant en solution. Par différence, on a la quantité de manganèse combinée à l'acide borique et l'on en déduit le poids de ce dernier. Bodewing (4) n'a pas obtenu de bons résultats avec cette méthode. Carnielli obtient avec elle des chiffres variant entre 99,5 et 101,5 o/o de l'acide borique à doser.

### C. — Méthodes physiques

La méthode physique la plus intéressante est la méthode spectroscopique. Le principe en est dû à Ballmann et à Föhr. On verse dans de l'eau distillée des quantités croissantes de la solution boriquée à doser jusqu'à ce qu'une goutte de liquide portée dans la flamme sur un filtre de platine donne les raies spectrales Bα et Bβ. Elles apparaissent pour une concentration donnée, déterminée à partir d'une solution type. Carnielli déclare cette méthode très exacte, donnant entre

1. *B. soc. chim.*, t. V, 1909, p. 217.
2. *Ann. de chim. et de phys.*, juin 1909.
3. *Chem. News.*, t. XLVI, p. 286, 1883.
4. *Zeitsch. f. anal. Chem.*, 1884.

100,35 et 100,06 o/o pour des solutions dans l'eau pure. Muraro (1) l'estime exacte à 1 o/o près en présence de sels de soude, de potasse ou de magnésie.

Wynter Blyth (2) a proposé de doser l'acide borique d'après la variation de pouvoir rotatoire qu'éprouve, en présence de la solution à titrer, une solution d'acide tartrique, ou d'après la conductivité électrique de la solution d'acide borique. Ces méthodes ne peuvent s'appliquer qu'à des solutions pures et suffisamment concentrées ; de plus, en ce qui concerne la méthode polarimétrique, on sait que les déterminations au polarimètre sont sujettes à des erreurs individuelles non négligeables.

### Séparation de l'acide borique des milieux complexes

Nous avons vu que presque toutes les méthodes de dosage de l'acide borique nécessitent la séparation d'avec les bases et les sels auxquels il se trouve combiné et mélangé. Tout dosage volumétrique est impossible en présence de phosphates ; les réactifs comme le bleu C4B et la phtaléine sont sensibles à l'acide carbonique. Heureusement, l'acide borique présente une propriété qui permet de le séparer intégralement de toutes les bases et en même temps de tous les acides qui pourraient en gêner la titration : il se combine facilement en présence d'un acide fort avec les alcools méthylique et éthylique en donnant des éthers très volatils que peut entraîner une simple distillation.

Ebelmen (3) a le premier préparé l'éther éthylborique ; il constate sa grande volatilité, ainsi que celle de l'acide borique en présence d'alcool méthylique et suppose dans ce dernier cas la formation d'un éther analogue qu'il n'a pas

1. *Gazz. chim. Ital.*, t. XXXII, p. 173, 1902.
2. *J. of chem. soc.*, t. LXXV, p, 722, 1899.
3. *C. R. Ac. des Sc.*, t. XVIII, p. 1202, 1844.

préparé. C'est en 1887 que Gooch (1) et Rosenbladt (2) ont proposé l'entraînement à l'état de borate de méthyle comme méthode générale de séparation de l'acide borique, applicable au dosage. Moissan (3) emploie la méthode de Gooch avec quelques modifications pour doser le bore dans les borures : le composé boré est transformé en acide borique par chauffage en tube scellé avec de l'acide azotique ; l'entraînement de l'acide borique à l'état de borate de méthyle est fait en présence d'acide azotique par sept épuisements successifs avec 10 cc. d'alcool méthylique chaque fois. L'appareil se compose d'un petit ballon où l'on place la matière contenant l'acide borique avec l'alcool méthylique et l'acide azotique. Une ampoule munie d'un robinet permet d'y introduire à nouveau de l'acide et de l'alcool. Il plonge dans un bain de chlorure de calcium ; un réfrigérant conduit les vapeurs dans une petite fiole conique reliée à un tube de Will et Warentrap garni d'ammoniaque. Quand l'opération est terminée, on transvase l'ammoniaque sur le contenu méthylique de la fiole, et on évapore au bain-marie à petit volume, en maintenant en présence d'un excès d'ammoniaque. On transvase alors le tout sur de la chaux pure calcinée et pesée dans un creuset de platine. On dessèche, on calcine vigoureusement ; la chaux est décarbonatée, les nitrates sont décomposés et l'augmentation de poids du creuset donne directement le poids d'acide borique qui est combiné à la chaux. Cette méthode est très longue et demande de grandes précautions au début de la calcination pour éviter les projections.

Jay et Dupasquier (4) en 1895 emploient pour le dosage de l'acide borique dans les cendres végétales la méthode d'entraînement méthylique. Leur appareil permet d'épuiser avec très peu d'alcool des quantités assez fortes de cendres. Deux

1. *Chem. News.*, t. LV, p. 7, 1887.
2. *Zeitsch. anal. Chem.*, t. XXVI, p. 18, 1887 et *B. soc. chim.*, t. XLVII, p. 169, 1887.
3. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXVI, p. 1087, 1893.
4. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXXI, p. 260, 1895.

ballons, placés chacun sur un bain-marie, sont reliés entre eux de façon que les vapeurs produites dans l'un viennent se condenser dans l'autre, et réciproquement. On ajoute l'alcool méthylique (25 à 30 cc.) au ballon contenant les cendres, nettement acidifiées par un excès d'acide sulfurique ; on chauffe ; quand l'alcool ne distille plus, on allume sous le second ballon dans lequel il a passé et qui contenait dès le début quelques centimètres cubes d'une solution de soude ou de potasse privée d'acide carbonique. L'alcool, débarrassé de l'acide borique par le chauffage en présence d'alcali, repasse dans le ballon contenant les cendres. On recommence plusieurs fois de suite l'opération. Les auteurs demandent 1 heure 1/2 pour entraîner entièrement 0 gr. 3 d'acide borique. J'ai exposé plus haut leur procédé de titration.

Gladding (1) a proposé l'entraînement de l'acide borique par un courant continu de vapeur d'alcool méthylique, en présence d'acide phosphorique, comme acide fixe aidant l'éthérification.

### § II. — Méthode employée dans ce travail

J'avais tout d'abord essayé les méthodes de Jay et Dupasquier, puis celle de Moissan ; elles sont longues et ne m'ont pas donné de résultats satisfaisants. Après de nombreux essais, je me suis rallié à la méthode de titration de Jones-Stock ; comme ces auteurs j'emploierai la mannite, car la glycérine commerciale contient des traces appréciables d'acide carbonique Bien entendu, je sépare au préalable l'acide borique par entraînement méthylique.

*Séparation de l'acide borique.* — L'appareil employé est du modèle de celui de Moissan (figure II). Il se compose d'un ballon B de 200 cc. environ de capacité totale, placé dans un bain de sable (je préfère l'emploi de ce dernier à celui d'un

1. *Am. Chem. soc.*, t. XX, p. 288, 1898.

bain de chlorure de calcium pour deux raisons : il est plus propre et la chauffe est plus rapide). Ce ballon, fermé d'un bouchon percé de deux trous, est surmonté d'une ampoule à robinet A qui permet d'introduire de nouveaux liquides pendant l'opération, et d'un tube coudé qui le relie à un réfrigérant R. Le réfrigérant laisse écouler le distillat dans une

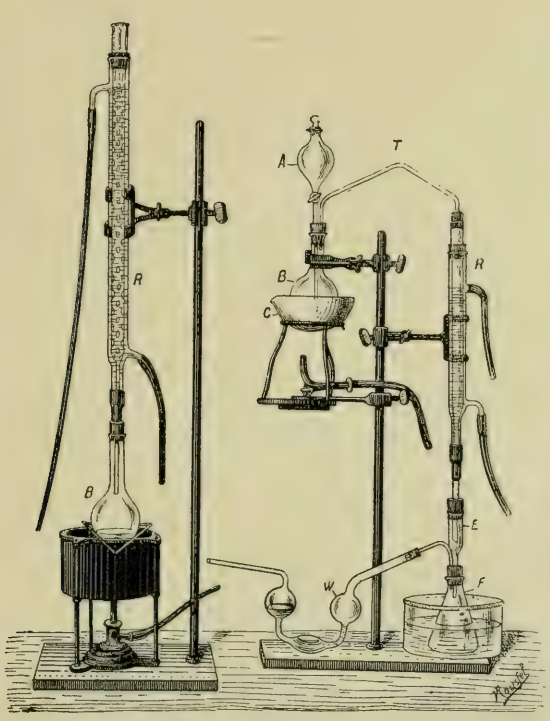



Fig. 2. — Appareil pour le dosage de l'acide borique.

fiole conique F, fermée elle aussi d'un bouchon à deux ouvertures ; l'une laisse passer l'extrémité du réfrigérant, l'autre un petit tube coudé qui fait communiquer la fiole avec un tube de Will et Warentrap W. Le tout est monté sur un même support.

On introduit la substance dans laquelle on veut doser l'acide borique (borate séché ou cendres végétales) dans le ballon de

200 cc. avec 50 cc. d'alcool méthylique (1). On monte le ballon sur l'appareil, dans le bain de sable et, goutte à goutte, par l'ampoule à robinet on fait tomber un excès d'acide sulfurique : le liquide s'échauffe rapidement et entre en ébullition. Il est donc nécessaire quand on opère ainsi en absence d'eau d'ajouter l'acide quand le ballon est monté sur l'appareil, autrement on risquerait des pertes, l'éther méthylborique étant très volatil. On chauffe alors le bain de sable ; l'alcool distillé, se condense dans le réfrigérant, entraînant l'éther borique ; la fiole conique reçoit le distillat. Les vapeurs qui pourraient s'échapper sont retenues par barbottage dans l'eau de baryte ou simplement l'alcool méthylique dont on a chargé le tube de Will avant l'opération. Dans le cas des cendres végétales, c'est avec de l'alcool méthylique qu'il faut le charger, autrement, étant donnée la quantité d'acide carbonique qu'elles dégagent au moment où l'on ajoute l'acide sulfurique, on s'encombrerait d'une masse de carbonate de baryte et par suite d'une quantité de liquide qui gènerait plutôt la titration. On distille jusqu'à apparition dans le ballon de légères fumées blanches; on laisse refroidir quelques instants et on introduit par l'ampoule 20 cc. de nouvel alcool méthylique. On distille.

Tout l'acide borique est passé à la première distillation ; la seconde est plutôt destinée à rincer l'appareil.

On verse sur le contenu de la fiole après les deux distillations l'alcool méthylique du tube de Will et Warentrapp et on ajoute au liquide obtenu une ou deux gouttes d'une solution de phtaléine. Par addition d'eau de baryte on amène à coloration franchement rouge et on ajoute un excès de baryte. On évapore alors l'alcool méthylique par distillation au bain-marie. L'acide borique reste fixé à l'état de borate de baryum. Quand il ne reste plus d'alcool, on neutralise la solu-

1. Lorsqu'il s'agit d'un borate ou d'un mélange de peu de volume, 20 cc. d'alcool méthylique suffisent pour la première extraction et 10 pour la seconde. Les chiffres donnés sont ceux employés pour les cendres végétales qui sous un grand volume renferment peu de bore.

tion par de l'acide chlorhydrique au 1/10e. La liqueur se décolore ; à ce moment on ajoute une goutte d'hélianthine et on continue l'addition d'acide chlorhydrique jusqu'à virage de celle-ci au rose. On met une goutte d'acide au dixième en excès.

Le liquide ainsi acidifié est porté à ébullition au réfrigérant ascendant pendant environ dix minutes pour en chasser les traces d'acide carbonique. Le réfrigérant ascendant empêche la concentration du liquide et l'entraînement de traces d'acide borique par la vapeur d'eau. Ceci fait, la liqueur est prête pour la titration.

*Titration.* — Le contenu de la fiole est versé dans un verre à pied ; on rince à l'eau bouillie. A partir de ce moment tous les réactifs que nous allons employer, sauf, bien entendu, l'eau de baryte titrée, ont été débarrassés de l'acide carbonique par ébullition.

A l'aide d'une burette on ajoute goutte à goutte à la liqueur un mélange d'iodure et d'iodate de potassium (solution obtenue en mélangeant 1 volume de solution saturée d'iodate, 1 volume de solution d'iodure à 20 o/o et 4 volumes d'eau). L'iode précipité est décoloré au fur et à mesure par quelques gouttes d'hyposulfite de soude au dixième. Quand l'iode ne précipite plus, la solution qui était rose par l'hélianthine prend la teinte neutre : l'acide chlorhydrique en excès a été saturé. On titre alors l'acide borique avec une solution de baryte étendue titrée au préalable dans les mêmes conditions avec une solution d'acide borique de teneur connue (acide borique pesé aprés dessication au vide à 30° et dissous dans l'eau distillée bouillie). La liqueur ne tarde pas à devenir rose (phtaléine du début de l'opération) sous l'influence de l'addition de baryte. On ajoute par petites portions de la mannite pure pulvérisée ; le liquide redevient jaune clair ; on verse à nouveau de la solution de baryte, puis une pincée de mannite, et ainsi de suite jusqu'à ce que la coloration rose persiste après une addition nouvelle de mannite. D'après le volume

de solution titrée de baryte, on a la quantité d'acide borique en présence.

Cette méthode de titration, avec emploi de la mannite et d'une solution de baryte titrée est la seule qui m'ait donné des résultats constants. Les erreurs possibles oscillent entre 0,2 et 0,5 o/o.

L'emploi de l'entraînement en deux distillations seulement est justifié par l'expérience. En opérant *en absence d'eau et en présence d'un notable excès d'acide sulfurique*, tout l'acide borique est entraîné par les 50 cc. d'alcool méthylique de la première distillation.

0 gr. 0888 d'acide borique pesé sec sont entraînés dans l'appareil par 20 cc. d'alcool méthylique; le distillat de ce premier entraînement est titré par la méthode indiquée : on obtient 0 gr. 0892 soit une erreur de 0 mgr. 4 en plus.

Un second entraînement est fait avec 10 cc. d'alcool ; on titre, une seule goutte de solution de baryte fait virer au rose persistant. Il ne restait donc plus d'acide borique ou seulement des traces.

Il est donc tout à fait inutile de faire comme Moissan, sept entraînements successifs, ou comme Jay des passages pendant 1 h. 1/2. En employant du premier coup une quantité d'alcool suffisamment grande, un excès d'acide sulfurique et en opérant sur une matière desséchée au préalable, l'entraînement est quantitatif avec les deux distillations préconisées.

Voici d'ailleurs un tableau de dosages obtenus avec la méthode décrite à partir d'acide borique pesé sec, entraîné dans l'appareil et titré de la manière indiquée. Les deux derniers de ces dosages ont été faits en présence de fluorure de sodium (Jay donnait les fluorures comme apportant des perturbations dans le dosage par sa méthode).

| Acide borique pesé | Acide borique titré | Différence absolue | Différence o/o |
|---|---|---|---|
| — | — | — | — |
| mgr. | mgr. | | |
| 116,4 | 116,42 | + 0,02 | + 0,02 |
| 117,1 | 117,02 | — 0,08 | — 0,07 |
| 81,4 | 81,53 | + 0,13 | + 0,17 |
| 72,6 | 72,69 | + 0,09 | + 0,12 |
| 69,5 | 69,70 | + 0,20 | + 0,28 |
| 67,3 | 67,37 | + 0,07 | + 0,10 |
| 47,0 | 46,70 | — 0,30 | — 0,62 |
| 28,0 | 28,20 | + 0,20 | + 0,70 |
| 22,3 | 22,70 | + 0,40 | + 1,90 |
| avec fluorure de Na : | | | |
| 94,7 (70 mgr. NaF) | 94,56 | — 0,14 | — 0,15 |
| 113,0 (20 mgr. NaF) | 114,0 | + 1,00 | + 0,87 |

La liqueur titrée qui a servi au dosage correspond à 0 mgr. 5 d'acide borique pour 1/10 cc. Les différences absolues maxima dans cette série de dosages sont — 0,14 et + 0,4. Elles sont dans les limites des erreurs acceptables. Nous sommes, en résumé, en possession d'une très bonne méthode de dosage. On ne peut guère demander mieux à une méthode volumétrique.

# CHAPITRE IV

## DOSAGE DE L'ACIDE BORIQUE CHEZ LES VÉGÉTAUX

### § I. — Historique

Les premières déterminations quantitatives d'acide borique chez les végétaux sont dues à Jay. Des analyses de cet auteur, il ressort que les cendres des divers fruits comestibles renferment des proportions de cet acide variant de 1 gr. 5 à 6 gr. 4 par kilogramme. Les varechs, les feuilles de platane, les sommités d'absinthe, les fleurs de chrysanthème et les oignons comestibles en contiennent entre 2 gr. 1 et 4 gr. 6. Les Graminées, les champignons de couche et le cresson sont les plantes les moins riches en acide borique, la dose ne dépassant pas 0 gr. 5 au kilogramme de cendres. Les vins en renferment de 4 gr. 7 à 16 gr. 5 pour 1.000 de cendres ; ce qui correspond à 0 gr. 0105 et 0 gr. 22 par litre de liquide primitif. Des cidres préparés au laboratoire de Jay lui ont présenté une teneur en acide borique variant de 0 gr. 011 à 0 gr. 017 par litre.

Azarello a dosé l'acide borique dans 84 échantillons de vins de Sicile ; les plus riches en bore contiennent, d'après lui, 0 gr. 041 $BO^3H^3$ par litre. Ses dosages ont été faits à l'état de fluoborate de potassium.

### § II. — Recherches personnelles

Je donne ci-dessous une trentaine de dosages d'acide borique dans les centres de diverses plantes ; ils ont été faits avec

la méthode que j'ai décrite au chapitre précédent. Je me suis attaché à doser l'acide borique dans des végétaux non étudiés par Jay : plantes non cultivées et principalement arbres forestiers. Les plantes ont été recueillies dans des sites géologiques variés : en Morvan, aux environs de Lormes (Nièvre), sur un terrain à granulite ; à Moresnet (frontière germano-belge) sur un sol argilo-calcaire ; aux environs de Nuits-Saint-Georges (Côte-d'Or) et aux environs de Paris ; en Corse, près de Pero Casavecchie où dominent les gneiss et les micaschistes des terrains primitifs ; en Auvergne, près de Clermont-Ferrand, terrain à roches éruptives trachytiques ; à Essen, dans la Prusse rhénane, en terrain houillier. Les deux algues ont été recueillies sur les côtes de la Manche, à Port-Blanc (Côtes-du-Nord).

Il est difficile par une simple calcination d'obtenir avec les végétaux des cendres exemptes de carbone par une chauffe ménagée, c'est-à-dire non susceptible de volatiliser les chlorures. On se trouve ainsi pris entre deux causes d'erreur : ou bien les cendres restent charbonneuses, ou bien elles ne renferment plus la totalité des matières minérales contenues dans la plante. Nous avons tourné la difficulté en opérant de la façon suivante : les plantes sont calcinées au moufle à température relativement basse ; elles sont grises et mêmes noires pour quelques-uns des échantillons, comme pour les graines par exemple. C'est sur une portion des cendres ainsi obtenues (cendres brutes) qu'on dose l'acide borique. Sur une autre portion on détermine la quantité exacte de matières minérales qu'elles contiennent : on les lave à l'eau chaude ; les eaux de lavage sont évaporées à sec et le résidu d'évaporation pesé à poids constant ; les cendres lavées, débarrassées par conséquent des chlorures, sont calcinées au rouge vif jusqu'à poids constant. En additionnant le poids du résidu des matières solubles et ce dernier poids, on a la quantité exacte de substances minérales (cendres réelles) contenues dans les cendres brutes. On ramène par le calcul au poids de la plante séchée et la quantité d'acide borique dosé est ramené à 100 grammes

de ces cendres réelles. Les chiffres du tableau suivant sont ceux qui se rapportent aux cendres réelles. Les dosages sont faits chaque fois sur 5 grammes de cendres brutes (1).

L'eau de baryte titrée, employée dans tous les dosages du tableau suivant, correspondait à 7 mgr. 043 par centimètre cube.

Plusieurs dosages ont été souvent faits sur un même échantillon de cendres ; ils ont toujours été concordants ; je juge inutile d'en surcharger le tableau. Je n'en citerai qu'un. Ayant obtenu avec une laminaire la teneur en acide borique de 0 gr. 380 o/o de cendres brutes, je fis un second dosage sur une autre portion des mêmes cendres après y avoir ajouté un poids connu d'acide borique. Le poids ajouté était 67 milligrammes ; avec les chiffres obtenus dans ce second dosage, je trouvai un total de 85 mgr. 92 pour l'acide borique ajouté et celui présent dans 5 grammes de cendres. Le calcul me donna avec ce chiffre 0 gr. 378 d'acide borique pour cent des cendres brutes. C'est assez dire l'exactitude de la méthode et l'impossibilité de toute erreur grossière dans son emploi.

## CRYPTOGAMES

| | Proportion d'acide borique pour cent de cendres | Proportion d'acide borique pour cent de matière sèche |
|---|---|---|
| ALGUES | | |
| 1. *Fucus vesiculosus*, L. . . . . Thalle, Manche ; cendres : 15,58 o/o de matière sèche. | 0,614 | 0,0957 |
| 2. *Laminaria saccharina*, Lamx. . . . . Thalle, Manche ; cendres : 8 o/o. | 0,682 | 0,0546 |
| CRYPTOGAMES VASCULAIRES | | |
| 3. *Pteris aquilina*, L. . . . . Frondes, Essen ; cendres : 14,64 o/o. | 0,250 | 0,0367 |

1. Je dois remercier ici M. Javillier qui a mis à ma disposition un certain nombre de cendres de plantes qu'il avait préparées avec un soin minutieux pour son étude sur la présence et le rôle du zinc dans les végétaux (Thèse, Paris, 1908).

## PHANEROGAMES

| GYMNOSPERMES | Proportion d'acide borique pour cent de cendres | Proportion d'acide borique pour cent de matière sèche |
|---|---|---|
| CONIFÈRES | | |
| 4. *Abies pectinata*, D. C. . . . . | 0,504 | 0,0045 |
| Tige jeune, Lormes ; cendres : 0,88 o/o. | | |
| 5. Feuilles de la même plante. . . . . | 0,346 | 0.0091 |
| Cendres : 2,63 o/o. | | |
| 6. *Pinus strobus*, L. . . . . | 0.211 | 0,0074 |
| Feuilles, Lormes ; cendres : 3,5 o/o. | | |
| 7. *Picea excelsa*, D. C. . . . . | 0.292 | 0,0235 |
| Tronc jeune, Lormes ; cendres : 8,02 o/o. | | |
| 8. Feuilles de la même plante . . . . . | 0,221 | 0,0070 |
| Cendres : 3,18 o/o. | | |
| ANGIOSPERMES | | |
| GRAMINÉES | | |
| 9. *Blé* (graines) . . . . . | 0,437 | 0,0085 |
| Cendres : 1,86 o/o. | | |
| 10. *Avoine* (graines) . . . . . | 0,309 | 0,0108 |
| Cendres : 3,51 o/o. | | |
| 11. *Maïs* (tige et feuilles). . . . . | 0,140 | 0,0190 |
| Cendres : 13,6 o/o. | | |
| BÉTULACÉES | | |
| 12. *Betula alba*, L. . . . . | 1,175 | 0,0135 |
| Ecorce, Lormes ; cendres : 1,15 o/o. | | |
| SALICACÉES | | |
| 13. *Salix capræa*, L. . . . . | 0,208 | 0,0088 |
| Rameaux et feuilles, Lormes ; Cendres : 4,23 o/o. | | |
| CORYLACÉES | | |
| 14. *Carpinus betulus*, L. . . . . | 0,272 | 0,0174 |
| Feuilles, Lormes ; cendres : 6,39 o/o. | | |
| 15. *Corylus avellana*, L. . . . . | 0,234 | 0,0248 |
| Feuilles, Lormes ; cendres : 10,58 o/o. | | |
| CASTANÉACÉES | | |
| 16. *Castanea vulgaris*, Lam. . . . . | 0,241 | 0,0095 |
| Feuilles, Lormes ; cendres : 3,92 o/o. | | |
| 17. *Fagus sylvatica*, L. . . . . | 0.207 | 0,0123 |
| Feuilles, Lormes ; cendres : 5,90 o/o. | | |

| | Proportion d'acide borique pour cent de cendres | Proportion d'acide borique pour cent de matière sèche |
|---|---|---|
| CUPULIFÈRES | | |
| 18. *Quercus robur*, L. . . . . | 0,205 | 0,0118 |
| Feuilles, Lormes ; cendres : 5,75 o/o. | | |
| URTICACÉES | | |
| 19. *Ficus carica*, L. . . . . | 0,312 | 0,0454 |
| Feuilles, Corse ; cendres : 14,51 o/o. | | |
| 20. *Cannabis sativa*. L . . . . . | 0,123 | 0,0088 |
| Graines ; cendres : 7,17 o/o. | | |
| OLÉACÉES | | |
| 21. *Olea europœa*, L. . . . . | 0,271 | 0,0104 |
| Rameaux sans feuilles, Corse ; Cendres : 3,83 o/o. | | |
| 22. Feuilles de la même plante. . . . . | 0,184 | 0,0112 |
| Cendres : 6,05 o/o. | | |
| COMPOSÉES | | |
| 23. *Tussilago farfara*, L. . . . . | 0,144 | 0,0359 |
| Feuilles ; cendres : 24,79 o/o. | | |
| CAPRIFOLIACÉES | | |
| 24. *Sambucus nigra*, L. . . . . | 0,145 | 0,0089 |
| Rameaux avec feuilles et fruits, Lormes ; Cendres : 6,15 o/o. | | |
| ROSACÉES | | |
| 25. *Prunus spinosa*, Tourn. . . . . | 0,180 | 0,0094 |
| Rameaux, Nuits ; cendres : 5,24 o/o. | | |
| LÉGUMINEUSES | | |
| 26. *Medicago sativa*, L. . . . . | 0,183 | |
| Graines ; cendres : X... | | |
| 27. *Robinia pseudo-acacia*, L. . . . . | 0,205 | 0,0176 |
| Feuilles, Lormes ; cendres : 8,56 o/o. | | |
| SAPINDACÉES | | |
| 28. *Æsculus hippocastanum*, L. . . . . | 0,323 | |
| Tronc, Paris ; cendres : X... | | |
| AMPÉLIDACÉES | | |
| 29. *Vitis vinifera*, L. . . . . | 0,234 | 0,0105 |
| Tige, Nuits ; cendres : 4,49 o/o. | | |
| RENONCULACÉES | | |
| 30. *Anemone pulsatilla*, L. . . . . | 0,171 | 0,0125 |
| Tige et feuilles, Auvergne ; cendres : 7,27 o/o. | | |

Quelles sont les remarques que peut nous suggérer l'examen de ce tableau ?

Les algues marines renferment de grandes quantités d'acide borique : cela s'explique facilement par la grande teneur du milieu marin en bore.

Aucune famille particulière de plantes terrestres, parmi celles dont j'ai analysé un ou plusieurs types, ne semble se distinguer spécialement par une plus grande teneur en bore. En général, les plantes annuelles : maïs, tussilage, anémone, paraissent avoir les cendres les moins riches en bore. Chez un même végétal, les parties durables, écorce et bois, sont plus riches que les feuilles et ceci même chez les arbres à feuilles persistantes ; j'ai observé ce fait dans tous les cas où il m'a été donné d'analyser les cendres des feuilles et celles des parties ligneuses d'une même plante :

| | Feuilles | Tiges | |
|---|---|---|---|
| *Abies pectinata.* . . | 0,346 | 0,504 | Acide borique pour 100 grammes de cendres. |
| *Picea excelsea* . . . | 0,221 | 0,292 | |
| *Olea europœa* . . . | 0,184 | 0,271 | |

L'écorce de bouleau donne des cendres exraordinairement riche en acide borique : 1 gr. 17 pour 100 grammes de cendres réelles, proportion, vérifiée d'ailleurs par plusieurs dosages successifs, qui dépasse de beaucoup la teneur des cendres d'algues marines.

Nous pourrons peut-être voir dans cette localisation du bore dans les tissus durables des végétaux et chez les plantes vivaces une indication sur son rôle dans la nature végétale, si nos études de la seconde partie nous permettent d'affirmer son utilité.

# DEUXIÈME PARTIE

## MÉTHODE SYNTHÉTIQUE. UTILITÉ DU BORE CHEZ LES VÉGÉTAUX

Après avoir, dans la première partie, démontré la présence du bore dans les végétaux et fixé par des dosages l'ordre de grandeur des quantités présentes, nous sommes amenés à nous demander si cet élément a une influence sur la vie végétale. Nous avons dit que de la présence d'un élément dans un être organisé on ne pouvait conclure à son utilité dans le fonctionnement vital. La dissémination du bore à la surface du globe donne de grands fondements à l'hypothèse de son existence accidentelle chez les végétaux. En effet, Trinchinetti (1) a démontré, en 1863, qu'il n'existe pas dans les racines une faculté de sélection en ce qui concerne l'absorption des substances qui leur sont présentées.

Dehérain (2) a donné de ce fait une nouvelle démonstration par la caractérisation du sodium dans des haricots cultivés dans des solutions de sel marin : on sait qu'à l'état normal cette plante ne prend pas de sodium De plus, il n'y a pas d'excrétion possible par les racines, une fois la matière minérale absorbée (Walter, Demoussy) (3). Tout ce que la plante absorbe est absorbé sans choix et n'en peut plus sortir.

1. *Salla facolta assorbente delle radice de vegetabili.* Milano, 1863.
2. *Ann. agron.* ; t. IV, p. 321.
3. *Ann. agron.* ; t. XXV, pp. 497 et 561.

Seules des expériences directes nous permettent de savoir si le bore a une action dans la vie des végétaux. La *méthode synthétique*, qui comporte la fabrication de milieux synthétiques avec et sans l'élément dont on veut étudier le rôle, est seule apte à nous fournir la démonstration cherchée. Des expériences culturales sur la terre arable activeront cette démonstration et nous renseigneront sur la valeur de l'élément employé comme engrais catalytique.

Nous avons vu que c'est sous forme d'acide borique que le bore se trouve engagé dans les cendres végétales et disséminé dans les sols. C'est donc l'action de cet acide que nous serons appelés à étudier : l'insolubilité du bore métallique et des borures rend d'ailleurs impraticable pour notre genre d'expérience l'emploi d'autres formes de cet élément.

Dans un premier chapitre nous allons rechercher à l'aide de la méthode synthétique si les organismes inférieurs, ferments et moisissures sont favorablement influencés par la présence de petites quantités de bore.

Dans un second chapitre nous essayerons de résoudre la question en ce qui concerne les végétaux supérieurs.

# CHAPITRE PREMIER

## ACTION DE L'ACIDE BORIQUE SUR QUELQUES VÉGÉTAUX INFÉRIEURS

Au cours de ce chapitre l'action de l'acide borique sera étudiée sur trois organismes :

1° La levure.

2° Le ferment bulgare.

3° L'*Aspergillus niger*.

L'étude portera principalement sur la recherche de doses favorables. En passant nous irons jusqu'aux doses toxiques afin de nous rendre compte de la valeur de l'acide borique comme antiseptique.

### § I. — Action sur la levure.

Dès 1872, Dumas (1) constate que l'addition d'acide borique ne hâte ni le départ, ni la fin de la fermentation alcoolique et que, avec cent fois l'équivalent en acide borique de l'acidité propre à la levure, la fermentation ne se manifeste plus. Les travaux de Rabuteau et Papillon (2) et de Petit (3) confirment ceux de Dumas. Schnetzler (4) et Duclaux (5) étudient l'action du borax sur la fermentation alcoolique, mais ici

1. J. B. Dumas. « Recherches sur la fermentation alcoolique ». *Ann. Chim. et Phys.*, et *C. R. Ac. des Sc.*, t. LXXV, p. 277, 1872.
2. *C. R. Ac. des Sc.*, t. LXXV, p. 755, 1872.
3. *C. R. Ac. des Sc.*, t. LXXV, p. 881, 1872.
4. *C. R. Ac. des Sc.*, t. LXXX, p. 469, 1875.
5. *Traité de Microbiologie*, t. III, p. 492.

intervient une question particulière : celle de l'alcalinité du milieu, défavorable au fonctionnement de la levure ; la fermentation est cependant encore complète en présence de 4 o/o de borax. Biernacki (1), dans une étude générale sur l'action des antiseptiques sur la levure, note, pour l'acide borique comme pour les autres antiseptiques, l'existence d'une dose optima et celle d'une dose mortelle. Il fermente du glucose par un certain poids de levure pressée et note les quantités d'acide carbonique dégagées pour des temps donnés. Il obtient de la sorte en présence de doses croissantes d'acide borique une courbe des quantités d'acide carbonique dégagées ; l'optimum est pour la dose de 0 gr. 125 d'acide borique par litre. La dose mortelle, pour laquelle il n'y a plus de fermentation est de 40 grammes par litre. Rosenblatt et Mlle Rozenband (2) ont récemment constaté que dans des liquides saturés d'acide borique il y a fermentation presque complète du saccharose après 40 heures. Leur méthode basée sur le dosage du sucre n'est pas sujette aux critiques qu'on peut faire à celle de Biernacki dont ils infirment les expériences relatives à la dose mortelle.

Mon étude de l'action de l'acide borique sur la levure sera divisée en trois paragraphes :

1° Action sur la fermentation du glucose par la levure en masse. C'est la reprise des expériences de Biernacki. La levure n'est en présence que d'une solution de sucre dans l'eau pure.

2° Action sur le développement de la levure en présence d'un liquide fermentescible. C'est au point de vue de l'ensemble de mon travail la partie la plus importante. La levure est ensemencée en petite quantité dans ces expériences sur un milieu nutritif synthétique ; l'expérience dure plusieurs jours ; l'action de l'acide borique porte à la fois sur le développement des levures et sur la fermentation par les levures for-

1. *Pfluger's Archiv.*, 1891, p. 112.
2. *C. R. Ac. des Sc.*, juillet 1909, p. 309.

mées. Les résultats obtenus par cette méthode sont de la sorte presque uniquement fonction du développement et de la reproduction des levures.

3° Action sur l'accoutumance des levures au galactose. Cette dernière partie comportera l'étude d'une notion un peu spéciale due à Dienert (1). Une levure accoutumée au glucose ne fermente pas une solution de galactose additionnée de 0,66 o/o d'acide borique. En présence de cet acide, les levures semblent incapables de s'accoutumer au nouveau sucre, alors qu'elles fermentent très bien une solution de glucose additionnée de la même proportion d'acide borique. Une levure préalablement accoutumée au galactose fermente d'ailleurs bien ce sucre dans des milieux boriqués. Dans un mélange boriqué de glucose et de galactose, la levure accoutumée au glucose laisse le galactose inattaqué : ce qui pourrait donner une méthode intéressante de purification du galactose préparé à partir du lactose. L'étude de cette curieuse propriété m'a paru intéressante à reprendre, d'autant plus que Dienert ne donne que peu de détails à son sujet.

### 1° *Fermentation du glucose par les levures en masse.*

La méthode expérimentale employée est à peu de choses près celle de Biernacki, mais au lieu d'observer un dégagement gazeux (Duclaux appuie une partie de sa critique des expériences de Biernacki sur les inconvénients et surtout l'imprécision que présente une mesure gazeuse faite dans ces conditions), la titration du glucose non consommé nous renseigne sur la marche de l'expérience.

On fait des séries de tubes à essai contenant 10 cc. d'une solution de glucose pur à 12 gr. 5 par litre et des doses croissantes d'acide borique; dans chaque tube on introduit 0 gr. 100 de levure pressée, d'une même préparation, exactement pesée.

1. Dienert. « Sur la fermentation du galactose et sur l'accoutumance des levures à ce sucre ». *Ann. Inst. Past.*, t. XIV, p. 139, 1900.

Les tubes sont placés à l'étuve à 28°. La fermentation est arrêtée en même temps dans tous les tubes d'une même série par chauffage à l'autoclave à 115°. Le sucre est dosé par la méthode proposée par G. Bertrand (1).

Voici les résultats obtenus sur trois séries, pour des temps variés de fermentation. Chaque tube contient 125 milligrammes de sucre au départ.

| Acide borique en millionièmes | Sucre restant après | | |
|---|---|---|---|
| | 27 heures | 6 heures | 5 heures |
| | | mgr. | mgr. |
| 0 | 0 | 49,0 | 51,6 et 53,6 |
| 50 | 0 | 56,9 | 54,7 |
| 100 | 0 | 55,8 | 51,6 |
| 150 | 0 | 58,4 | 53,1 |
| 250 | 0 | 58,4 | |
| 500 | 0 | 55,2 | 55,2 |
| 1.000 | 0 | 59,5 | 60,5 |
| 5.000 | | | 58,0 |
| 6.000 | 0 | 70,2 | |
| 15.000 | 0 | 75,7 | |
| 30.000 | 51 mgr. 1 | 99,0 | |

De l'ensemble de ces trois expériences on peut tirer les conclusions suivantes : en suivant la fermentation par dosage du sucre restant on n'observe d'optimum pour aucune dose. La courbe du glucose restant monte lentement mais de façon sui-

1. G. Bertrand. « Le dosage des sucres réducteurs ». *Bull. Soc. Chimique*, 3e série, t. XXXV, p. 1285, 1906.

C'est de cette méthode très précise que je me suis toujours servi au cours de ce travail quand je n'indique pas un autre procédé.

vie. La dose mortelle n'est pas atteinte avec 30 grammes par litre d'acide borique, puisque pour cette dose 26 milligrammes de sucre ont disparu en six heures.

Dans ces conditions expérimentales, en l'absence d'un milieu nutritif et dans des temps aussi courts, l'action de l'acide borique porterait uniquement sur le phénomène fermentatif. On serait en quelque sorte dans les conditions d'une étude de l'action de l'acide borique sur la zymase. En réalité il est probable qu'il n'en est même pas ainsi ; car, d'après l'ensemble des recherches citées plus haut de Rosenblatt et Rozenband, les acides semblent ne passer que très difficilement à travers la membrane cellulaire de la levure.

Lorsqu'au lieu d'étudier seulement l'influence de l'acide borique sur la fermentation du sucre, nous recherchons en même temps celle qu'il peut exercer sur le développement de la levure, nous verrons une dose mortelle apparaître assez rapidement.

### 2° *Action sur le développement de la levure.*

Les expériences de cette série ont été faites par ensemencement de levures pures sur un liquide nutritif artificiel. La formule employée pour le liquide est la suivante :

| | |
|---|---|
| Phosphate monopotassique. . . . . | 7 gr. 5 |
| Tartrate d'ammoniaque . . . . . | 5 gr. 0 |
| Sulfate de magnésie . . . . . | 0 gr. 5 |
| Sulfate de calcium . . . . . | 0 gr. 25 |
| Chlorure de sodium . . . . . | 0 gr. 05 |
| Sulfate ferreux ammoniacal . . . . | 0 gr. 025 |
| Silicate de potasse . . . . . | 0 gr. 025 |
| Sulfate de manganèse . . . . . | 0 gr. 025 |
| Alun de potasse . . . . . | 0 gr. 025 |
| Saccharose . . . . . | 150 gr. |
| Eau distillée. . . . . | Q.S. pour 1.000 |

Les sels employés ont été vérifiés exempts de bore à l'aide des méthodes de recherche au papier de curcuma et à la flamme d'hydrogène exposées dans la première partie de ce travail. L'eau distillée préparée au laboratoire a été redistillée sous pression réduite dans un appareil en verre. L'eau distillée ordinaire contient des traces de cuivre qui la rendent peu favorable aux expériences sur les microorganismes.

Deux levures pures de vin ont été employées dans ces expériences : l'une est une levure de Saint-Gilles (Gard) vivant en profondeur ; l'autre est une levure de Château-Latour, vivant en surface et donnant rapidement un voile blanc plissé (1).

*Levure de profondeur.* — Six matras de 500 cc. sont remplis avec 500 cc. de liquide de culture contenant des doses croissantes d'acide borique. On ensemence après stérilisation avec un pied de cuve de quatre jours fait sur liquide nutritif exempt d'acide borique. Après dix jours de culture à la chambre étuve réglée à 26°, on dose le sucre non consommé par la méthode de G. Bertrand et l'alcool formé. Par différence entre le sucre restant et le sucre mis au début de l'expérience, on a le sucre consommé. Pour doser la petite quantité d'alcool qui a été formée, on neutralise à la soude 50 cc. du liquide, on distille à feu nu et on prend la densité des vingt-cinq premiers centimètres cubes distillés. En se servant des tables de correspondance de la teneur en alcool et de la densité, on a l'alcool contenu dans les vingt-cinq premiers centimètres cubes : le chiffre obtenu divisé par deux donne le titre alcoolique du liquide primitif.

Voici les résultats expérimentaux obtenus :

| Acide borique en millionièmes | Sucre consommé | Degré alcoolique du liquide |
|---|---|---|
| — | — | — |
| 0 | 34 gr. 4 | 2°30 |
| 10 | 34 gr. 1 | 2°27 |
| 50 | 34 gr. 7 | 2°44 |

1. Ces levures m'ont été fournies par M. Kayser auquel j'adresse mes remerciements.

| Acide borique en millionièmes | Sucre consommé | Degré alcoolique du liquide |
|---|---|---|
| — | — | — |
| 100 | 33 gr. 6 | 2°43 |
| 500 | 34 gr. 1 | 2°53 |
| 1.000 | 33 gr. 6 | 2°46 |

Les différences obtenues dans les six essais précédents sont dans les limites des différences individuelles et des erreurs possibles dans ce genre d'expériences. On peut donc admettre que, jusqu'à la dose de 1 gramme par litre, l'acide borique n'a pas d'action sensible, favorable ou défavorable, sur le développement de la levure.

*Levure de surface.* — Dans six matras de 1 litre 1/2 contenant 250 cc. de liquide de culture avec des doses d'acide borique croissantes, on ensemence une levure pure donnant un beau voile à la surface des liquides (levure de vin de Château-Latour). Les cultures sont maintenues à l'étuve à 28°. On dose le sucre, l'alcool et le poids de levure formée. Le poids de levure est obtenu par filtration du liquide après culture sur filtre taré. On dessèche à 105° à poids constant. Pour éviter d'avoir à laver les levures qui perdraient de leur matière sèche dans les lavages que rendrait longs la difficulté de la filtration, on pèse le filtre humide, et on retranche du poids sec obtenu le poids de sucre correspondant au liquide d'imbibition.

Voici les résultats de l'expérience (durée 16 jours) :

| Acide borique en millionèmes | Sucre consommé | Degré alcoolique du liquide | Poids de levure |
|---|---|---|---|
| — | — | — | — |
| 0 | 23 gr. 47 | 1°85 | 0 gr. 9425 |
| 10 | 25 gr. 06 | 1°60 | 0 gr. 9520 |
| 100 | 24 gr. 53 | 1°75 | 0 gr. 9335 |
| 500 | 25 gr. 37 | 1°50 | 0 gr. 9165 |
| 1.000 | 25 gr. 67 | 1°40 | 0 gr. 9690 |
| 10.000 | pas de levure développée. | | |

Il est impossible de conclure de cette expérience à l'existence d'une action favorisante des petites doses.

En résumé, pour la levure nous avons pu observer au cours de ces deux paragraphes que :

*Lorsque la levure agit en masse pour fermenter le glucose, on n'observe aucune dose optima : l'influence défavorable se manifeste pour des doses dépassant 1 gramme par litre, cependant les 3/5 du sucre sont encore fermentés après 27 heures en présence de 30 grammes par litre d'acide borique.*

*Lorsqu'on ensemence faiblement un liquide où la levure est susceptible de se développer, il ne paraît pas non plus exister de dose favorable ; tout développement est arrêté en présence de 10 pour mille d'acide borique.*

### 3° *Action sur l'accoutumance des levures au galactose.*

J'ai tout d'abord renouvelé l'expérience de Dienert en présence de quantités variées de glucose et de galactose. La levure employée m'a été fournie par M. Fernbach ; c'est une levure de distillerie de betteraves (levure D). Je me sers comme liquide de culture d'eau de touraillons additionnée de 0 gr. 25 de phosphate d'ammoniaque et de 1 gr. 5 d'acide tartrique par litre et de 10 o/o de sucre.

*Première expérience.* — 7 matras contenant chacune 50 cc. d'eau de touraillons sucrée avec des proportions variées de glucose et de galactose sont ensemencés, après stérilisation, avec une levure ayant 36 heures de culture sur de l'eau de touraillons glucosée. On prélève aseptiquement à différents moments une petite portion de liquide et on y dose le sucre.

Le galactose employé n'était pas du galactose pur ($\alpha_{[D]} = + 80 - 81°$), mais du galactose contenant environ 20 o/o de glucose ; son pouvoir rotatoire était + 75°4 à 15°. Dans le tableau ci-dessous, le galactose est compté en galactose pur.

| Proportion de sucres dans les matras en grammes | Sucre restant après | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 48 heur. | 4 jours | 8 jours | 13 jours |
| I. 5 gr. glucose. . . . . | 0,998 | 0,265 | 0,161 | 0,195 |
| II. 0,8 galactose, 4,2 glucose. . . | 1,302 | 0,889 | 0,507 | 0,287 |
| III. 1,6 galactose, 3,4 glucose . . | 1,820 | 1,520 | 1,175 | 0,811 |
| IV. 2 gr. galactose, 3 gr. glucose. | 2,236 | 2,029 | 1,617 | 1,26 |
| V. 2,4 galactose, 2,6 glucose. . . | 2,605 | 2,236 | 1,936 | 1,56 |
| VI. 3,2 galactose, 1,8 glucose . . | 3,250 | 2,906 | 2,311 | 1,62 |
| VII. 4 gr. galactose, 1 gr. glucose. | 4,131 | 3,943 | 3,941 | |

On observe après 24 heures un abondant dégagement d'acide carbonique pour les matras I, II, III, IV et V. Le matras VI mousse faiblement et pour VII on n'observe aucun dégagement.

Après huit jours on arrête le matras VII ; son contenu est déféqué au sous-acétate de plomb ; on filtre ; l'excès de plomb est enlevé par $SO^4H^2$ ; on filtre et le filtrat est amené à 25 cc. On dose le sucre et on observe la rotation que donne la solution au polarimètre. On obtient pour pouvoir rotatoire du sucre contenu dans la solution $\alpha_{[D]} = + 80°52$ à 15°. Nous obtenons donc un galactose parfaitement pur avec en quelque sorte un rendement théorique : 3 gr. 94 au lieu de 4 gr. Nous pouvons remarquer qu'à ce moment, la quantité de sucre resté dans les autres matras ne correspond pas à la proportion de galactose pur au départ. Déjà au quatrième jour il manquait du galactose aux matras V et VI. Au huitième il en manque à tous les matras, et les cultures continuées jusqu'au treizième jour nous font voir une diminution très sensible des solutions en sucre. Le galactose ne paraît donc pas rester entièrement inattaqué dans les mélanges de glucose et de

galactose en présence d'acide borique, comme l'indique Dienert.

Si l'on tient compte des 0 gr. 195 de sucre resté dans le matras glucosé, en supposant qu'il correspond aux matières réductrices qui ne sont point des sucres ou tout au moins des sucres fermentescibles et qui existent avant toute addition dans l'eau de touraillons, on voit que les proportions de galactose disparu par rapport au galactose pur présent au début de l'opération sont respectivement pour les matras :

| | |
|---|---|
| II. . . . | 88 o/o |
| III . . . | 61 o/o |
| IV . . . | 46 o/o |
| V. . . . | 43 o/o |
| VI . . . | 55 o/o |

Pour les cinq premiers, il semble qu'il y ait une relation entre le galactose disparu et la teneur en glucose. Tout paraît se passer comme si le glucose permettait une formation d'un grand nombre de levures, lesquelles, tout en ne paraissant pas fermenter le galactose, le font disparaître cependant soit par fermentation très lente, soit en s'en servant comme aliment par un autre mécanisme. On n'obtient de bons rendements en galactose purifié qu'en opérant en présence de très peu de glucose : 20 o/o par exemple comme dans le cas du matras VII. En ne poursuivant la culture que quatre ou cinq jours seulement, on aurait de meilleurs rendements. Mais la question se pose de savoir si, dans ce cas, le produit obtenu est réellement du galactose pur. C'est ce que nous montre l'expérience suivante :

*Deuxième expérience.* — J'ai essayé de préparer du galactose pur, par ce procédé, à partir d'eaux-mères d'une préparation de galactose faite par hydrolyse du lactose, par conséquent très riches en glucose (2 parties environ de glucose pour une de galactose).

Deux litres d'eau de touraillons sont additionnés de 240 grammes d'eaux-mères à l'état de sirop à demi-cristallisé

et de 6 gr. 6 pour 1.000 d'acide borique. On stérilise, on ensemence largement avec un pied de cuve sur touraillons glucosé de 250 cc., âgé de 72 heures.

Après 48 heures, la solution qui au début renfermait environ 200 grammes de sucre, soit 100 grammes par litre, n'accuse plus qu'un pouvoir réducteur correspondant à 22 gr. 45 de sucre par litre. Le pouvoir rotatoire est à ce moment de + 76°16 à 15° ; notre sucre contient encore 20 o o environ de glucose. Après quatre jours le pouvoir réducteur correspond à 10 gr. 03 de sucre par litre et le pouvoir rotatoire est de + 84°7. La culture est arrêtée le cinquième jour. On voit qu'entre le deuxième et le quatrième jour il y a eu plus de 50 o/o de sucre disparu, alors que, si seul le glucose avait été consommé, la diminution aurait dû être seulement de 20 o/o. Le galactose apparaît bien comme étant entraîné avec le glucose ou plus exactement consommé après celui-ci. Le produit final est-il du galactose pur : le dernier pouvoir rotatoire pris semble bien le montrer. Cependant la préparation a été continuée. On défèque au sous-acétate de plomb, l'excès de plomb est enlevé par l'hydrogène sulfuré ; on concentre dans le vide les liquides ; le sirop obtenu est repris par l'alcool ; les sels alcalins qui souillent la liqueur sont précipités par addition d'acide sulfurique dans le liquide alcoolique ; les sulfates de sodium et de potassium peu solubles dans l'alcool précipitent. On filtre, on concentre et le sirop est amorcé avec une trace de galactose pur ; il cristallise lentement. On essore et on lave à l'alcool le produit obtenu. Ce n'est pas du galactose parfaitement pur : il contient 15 o/o de matières non réductrices, parmi lesquelles de l'acide borique. Le pouvoir rotatoire qui correspond au sucre réducteur est de + 85°62. Il fond, en laissant dans la partie fondue un petit résidu blanc, vers 162° au bloc de Maquenne (1) C'est donc du galactose entièrement exempt de glucose.

1. Point de fusion du galactose = 162° (Müntz-Fisher) ; 163° (Bourquelot, Maquenne, Tanret). Point de fusion du glucose = 144 146°.

D'après les expériences qui précèdent, il paraît possible, comme l'avait observé Dienert, d'obtenir du galactose pur par fermentation d'un mélange de glucose et de galactose en présence d'acide borique, mais seulement dans des conditions très spéciales de concentration relative et de durée. On ne peut pas admettre l'opinion de cet auteur en ce qui concerne l'incapacité absolue qu'aurait la levure de ne pas employer le galactose mélangé au glucose en présence d'acide borique. La levure ne laisse pas le galactose inattaqué, sauf dans le cas où on ne lui offre dès le début que de faibles doses de glucose, 20 o/o au maximum.

*Troisième expérience.* — Dienert donne comme dose d'acide borique favorable 6 gr. 6 par litre pour obtenir l'inaccoutumance de la levure au galactose. J'ai essayé des doses variées sur un mélange de 6 gr. de glucose et de 4 gr. de galactose.

| | Acide borique o/o | Sucre restant | |
|---|---|---|---|
| | | Après 48 h. | Après 4 jours |
| | — | — | — |
| I . . . . | 0 | 3,44 | 0,75 |
| II. . . . | 0,2 | 4,06 | 3,547 |
| III . . . | 0,4 | 4,56 | 3,89 |
| IV . . . | 0,6 | 5,12 | 4,25 |
| V. . . . | 0,8 | 8,97 | 5,194 |

Le départ de la fermentation se fait d'autant moins rapidement que l'on a plus d'acide borique.

On voit que dès la dose de 0,2 o/o l'action empêchante sur l'accoutumance au galactose se fait nettement sentir : il reste encore 3 gr. 5 de sucre après 4 jours, alors que le matras sans acide borique n'en renferme plus que 0 gr. 75. Il était curieux de savoir si ces 0 gr. 75 de sucre restant dans le matras sans bore étaient un mélange de glucose et de galactose. J'en ai donc pris le pouvoir rotatoire : j'ai obtenu $\alpha_{[D]} = 85°9$.

C'est du galactose pur. Il semble donc que, même en

l'absence d'acide borique, c'est le glucose qui est consommé le premier. L'action de l'acide borique paraît donc être de retarder dans une mesure considérable la fermentation du galactose pour une levure non habituée à ce sucre, fermentation qui est déjà postérieure à celle du glucose en l'absence de bore.

Les doses entre 0,4 et 0,6 o/o semblent les plus favorables ; au delà le retard est par trop grand et porte aussi sur le glucose.

*Quatrième expérience.* — Je me suis demandé plus haut par quel mécanisme la levure fait disparaître le galactose en présence d'acide borique. Est-ce par fermentation très lente ou par une consommation spéciale de l'aliment hydrocarboné ? L'expérience suivante fait plutôt penser qu'il ne s'agit pas là de fermentation.

On sait qu'une levure ayant fermenté préalablement du galactose est susceptible de faire fermenter ce sucre en présence d'acide borique. Si donc notre levure placée dans le mélange de glucose et de galactose en présence de cet acide a fermenté une partie du galactose, elle devra se trouver accoutumée en quelque sorte à ce sucre et susceptible de le faire fermenter lorsqu'il se trouve pur en solution boriquée.

En réalité, il n'en est rien :

Après un passage de quatre jours sur un mélange de glucose et de galactose additionné de 0,66 o/o d'acide borique, la levure ne touche pas les solutions de galactose pur (1) en présence de 0,66 o/o d'acide borique, se comportant en cela comme la levure passée sur glucose.

Quatre tubes (I, II, III, IV) contiennent respectivement :

I et III, 10 cc. d'eau de touraillons glucosée à 10 o/o additionnés de 0,66 o/o d'acide borique.

1. J'adresse ici mes remerciements à M. P. Thomas qui a bien voulu mettre à ma disposition un échantillon de galactose purifié par la méthode au S. Ludwigii. Ce galactose présentait un pouvoir rotatoire $\alpha_{[D]} = 81^{\circ}2$ à $15^{\circ}$.

II et IV, 10 cc. d'eau de touraillons galactosée à 10 o o additionnés de 0,66 o/o d'acide borique.

On ensemence I et II avec une levure de quatre jours sur touraillon glucosé, III et IV avec la même levure passée quatre jours sur touraillon additionné de 6 o/o de glucose et de 4 o/o de galactose avec 0,66 o/o d'acide borique.

| | Sucre restant après | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 32 heures | 56 heures | 4 jours | 5 jours | 14 jours |
| | — | — | — | — | — |
| | gr. | gr. | gr. | gr. | gr. |
| Glucose I . . | 3,28 | 0,19 | 0,14 | » | » |
| Galactose II . | 10,16 | 9,53 | 9,50 | 9,50 | 10,0 |
| Glucose III. . | 8,01 | 6,15 | 0,36 | » | » |
| Galactose IV. | 10,02 | 10,0 | 9,53 | 9,50 | 10,0 |

Le tube II nous montre que le galactose pur est inattaqué en présence de l'acide borique, par une levure exempte de traitement préalable. Le tube IV nous montre qu'il en est de même si la levure a passé sur un mélange de glucose et de galactose boriqué.

Les conclusions possibles de cette troisième partie de l'étude sur les levures sont les suivantes :

1° Le galactose pur est inattaqué en présence de 0,66 o/o d'acide borique par une levure non accoutumée à lui, même après quatorze jours.

2° Mélangé au glucose, le galactose est laissé tout d'abord inattaqué, puis disparaît très lentement, probablement par un autre phénomène que la fermentation alcoolique, à moins qu'il ne soit au début de l'expérience dans une proportion égale ou supérieure à 80 o/o du sucre total.

3° En l'absence d'acide borique, c'est le galactose qui reste le dernier dans un mélange de glucose et de galactose.

L'influence de l'acide borique sur l'arrêt de l'accoutumance au galactose se manifeste pour des doses inférieures à 0,66 o/o, mais cette dose est la plus favorable.

5° La levure n'acquiert pas par passage sur glucose et galac-

tose boriqués l'accoutumance au galactose nécessaire pour lui permettre de fermenter le galactose pur en présence d'acide borique.

Le procédé peut servir à purifier le galactose impur, mais les rendements sont loin d'être théoriques.

Je n'ai pas cru devoir pousser plus loin ces expériences qui restent incomplètes à bien des égards, car elles sortent du cadre même de ce travail.

### § II. — Action sur le ferment lactique

Il était intéressant d'étudier l'action de l'acide borique sur un ferment figuré d'un autre type que la levure. Je me suis adressé au ferment bulgare qui coagule le lait par transformation du lactose en acide lactique. L'action chimique de ce ferment, décrit au point de vue bactériologique par Cohendy (1), a été très exactement étudiée par G. Bertrand et Weisweiller (2) et par G. Bertrand et Duchacek (3).

Je me suis servi d'un microbe provenant des cultures pures qui ont servi au travail de ces deux derniers auteurs : il coagule le lait en 48 heures et même souvent en 24 heures à la température de 29°, mais seulement lorsqu'il est habitué au lait sur lequel on le cultive ; le changement de lait cause un retard de un ou deux jours dans la coagulation ; c'est donc un organisme très sensible.

J'opère sur des matras remplis de 50 cc. de lait commercial pur centrifugé que j'additionne de doses variées d'acide borique ou de borax. On stérilise par une demi-heure de chauffage à 110°. Je fais pour chaque dose de bore un certain nombre de matras. Le tout est ensemencé en même temps, avec une même quantité de la même culture, et placé à l'étuve à 29° ;

1. *C. R. soc. de Biol.*, t. LX, mars 1906.
2. *Ann. de l'Inst. Past.*, t. XX, décembre 1906.
3. *Id.*, t. XXIII, mai 1909.

on suit de jour en jour par un dosage d'acide lactique la marche de la fermentation. Le dosage est fait chaque fois sur un matras de 50 cc. en employant la méthode par retour décrite dans le mémoire de G. Bertrand et Weisweiller. J'ai dû, à cause de l'acide borique présent dans les cultures y apporter une petite modification. L'acide borique est en effet acide à la phtaléine en présence de lactose ; le sucre ne se trouvant pas en quantité fixe dans toutes les cultures et pouvant d'autre part y être en quantité trop faible pour permettre que l'acide borique soit entièrement englobé dans la titration, j'ajoute au lait à titrer 15 cc. de glycérine. De la sorte tout l'acide borique présent est compris dans le dosage de l'acide lactique en présence de phtaléine, et comme les doses en sont connues il est facile par le calcul de faire la correction nécessaire.

Voici trois expériences faites dans ces conditions :

*Première expérience*

| Acide borique en millionièmes | Acide lactique o/o cc. de lait après | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 j. | 5 j. | 6 j. | 8 j. | 10 j. | 14 j. | 20 j. | |
| I. 0 . . . | 0,270 | 1,080 | 1,323 | 1,386 | 1,224 | 1,791 | 2,097 | caillot ferme. |
| II. 500 . | 0,243 | 0,405 | 0,819 | 0,990 | 0,972 | 1,197 | 1,296 | caillot plus rétracté que I. |
| III. 1.000. | 0,225 | 0,432 | | 0,639 | 0,657 | 0,630 | 0,774 | caillot mal formé |
| IV. 5.000. | 0,180 | 0,252 | | 0,234 | 0,279 | 0,279 | 0,261 | incoagulé. |
| V. 10.000. | 0,205 | 0.259 | | 0,223 | 0,205 | 0,196 | 0,262 | id. |
| VI. 30.000. | 0,057 | | | 0,075 | 0,075 | 0,093 | 0,183 | caillots dus à l'action de l'acide borique sur le lait à 115°. |

*Deuxième expérience*

| Acide borique en millionièmes | Acide lactique o/o cc. de lait après | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 j. | 2 j. | 3 j. | 4 j. | 6 j. | 8 j. | |
| I. 0 . . . | 0,324 | 0,612 | 0,990 | 1,350 | 1,710 | 1.836 | coagulé après 3 jours |
| II. 50 . . | 0,298 | 0,406 | 0,964 | 1,351 | 1,702 | 1,873 | id. |
| III. 100 . | 0,236 | 0,417 | 0,826 | 1,240 | 1,560 | 1,803 | coagulé après 4 jours |
| IV. 200 . | 0,240 | 0,327 | 0,682 | 1,170 | 1,492 | 1,692 | id. |
| V. 500. . | 0,216 | 0,288 | 0,468 | 0,666 | 1,314 | 1,404 | coagulé après 5 jours |

*Troisième expérience* (acide borique et borax)

| Acide borique en millionièmos | Acide lactique o/o cc. de lait après | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 2 jours | | 3 jours | | 10 jours | | |
| I. 0 . . . | 0,855 | | 1,368 | | 2,366 | | |
| II. 10 . . | 0,871 | 0,837 | 1,393 | 1,404 | 2,410 | 2,295 | coagulés |
| III. 20. . | 0,851 | 0.864 | 1,472 | 1,413 | | 2,331 | après |
| IV. 50. . | 0,887 | 0,792 | 1,438 | 1,422 | 2,377 | 2,286 | 2 jours |
| V. 100. . | 0,786 | 0,819 | 1,308 | 1,350 | 2,199 | 2,277 | |
| VI. 200 . | 0,709 | 0,720 | 1,266 | 1,260 | 2,221 | 2,268 | coagulés |
| VII. 500 . | 0,520 | 0,558 | 1,044 | 1,197 | 2,052 | 2,097 | après 3 jours |

Le second chiffre donné dans chaque colonne de ce dernier tableau est celui fourni par les matras contenant les doses de borax équivalentes à la dose d'acide borique.

A l'examen de ces tableaux on aperçoit que l'influence antiseptique de l'acide borique ne commence à se faire sentir que

vers les doses de 200 millionièmes. Elles n'est absolue qu'à partir de 5 grammes par litre : les laits restent alors incoagulés; mais il se forme encore de l'acide lactique avec 10 et même des traces avec 30 grammes par litre d'acide borique. Le microbe ne doit pas être tué, mais il ne se reproduit pas : c'est un fait analogue à ce que nous avons observé sur la levure qui fermente encore le sucre dans les liqueurs saturées d'acide borique, mais ne se reproduit plus à partir de 10 grammes par litre. L'action antiseptique de l'acide borique apparaît sous un jour particulier : n'empêchant pas les manifestations vitales de l'être déjà formé, mais arrêtant sa multiplication. Quant à un rôle favorisant, à peine voyons-nous une très faible augmentation pour les doses de 10, 20 et 50 millionièmes au troisième jour (tableau 3) et nous sommes bien près des erreurs expérimentales. Le dosage est inexact à 0 gr.05 d'acide lactique pour 100 cc. de lait, et il faut tenir compte des erreurs individuelles. En tous cas l'augmentation d'acide lactique est de 7 o/o pour le dosage le plus éloigné du témoin, et nous ne la trouvons que pour le troisième jour. Il est plus prudent de conclure à l'inexistence d'une action favorisante sur le bacille lactique, d'autant plus que dans l'expérience 2 la dose de 50 millionièmes favorable dans l'expérience 3 s'est montrée plutôt défavorable dans les trois premiers jours.

### § III. — Action sur les moisissures

On connaît, depuis le travail de Raulin (1), la sensibilité de l'*Aspergillus niger* à la présence dans son liquide de culture de petites doses d'éléments soit favorables, soit défavorables, Javillier (2) a montré que cette Mucédinée est encore sensible à la présence de 1/50.000.000 de zinc.

L'inactivité antiseptique de l'acide borique sur les moisis-

1. Thèse, Paris, 1870.
2. *Loc. cit.*

sures est un fait connu (1). Dans l'eau boriquée des pharmacies, qui est à 30 grammes par litre, se développent couramment des Penicillium, des Cephalosporium et même des levures colorées.

J'ai entrepris sur l'*Aspergillus niger* une série de cultures en absence ou en présence de quantités variables d'acide borique, dans le principal but de rechercher si une faible dose n'accélèrerait pas la végétation de la moisissure.

Le milieu de culture est le liquide de Raulin préparé avec des produits vérifiés exempts d'acide borique en solution dans de l'eau distillée dans un appareil de verre.

J'emploie sans aucune modification la formule de Raulin :

| | | |
|---|---|---|
| Eau distillée, q. s. pour. . | 1.500 | grammes |
| Sucre candi . . . . . | 70 | » |
| Acide tartrique . . . . | 4 | » |
| Nitrate d'ammoniaque . . | 4 | » |
| Phosphate d'ammoniaque . | 0,6 | » |
| Carbonate de potassium . | 0,6 | » |
| — de magnésium . | 0,4 | » |
| Sulfate d'ammoniaque . . | 0,25 | » |
| — de zinc . . . . | 0,07 | » |
| — de fer . . . . . | 0,07 | » |
| Silicate de potassium . . | 0,07 | » |

Des matras de 1.500 cc. reçoivent 250 cc. de ce liquide additionné des doses d'acide borique étudiées. On stérilise une demi-heure à 115°. On ensemence largement à partir d'une culture pure et les vases sont placés à la chambre étuve à 35°. La récolte est faite après quatre jours ; les mycéliums sont lavés rapidement, séchés à 100° et pesés. On fait trois matras par dose, de façon à éliminer autant que possible les causes d'erreur individuelles. Voici les chiffres expérimentaux trouvés dans deux expériences faites avec des doses peu

1. Planchon. Thèse, Paris, 1900.

élevées d'acide borique (ne dépassant pas 1 gramme par litre) :

| | Acide borique en millionèmes | Poids moyen d'un mycélium après quatre jours |
|---|---|---|
| 1° Exp. | 0 | 3 gr. 73 |
| | 0,04 | 3 gr. 85 |
| | 0,4 | 3 gr. 86 |
| | 4 | 3 gr. 82 |
| | 20 | 3 gr. 89 |
| | 40 | 3 gr. 75 |
| 2° Exp. | 0 | 3 gr. 80 |
| | 10 | 3 gr. 49 |
| | 50 | 3 gr. 67 |
| | 100 | 3 gr. 72 |
| | 500 | 3 gr. 63 |
| | 1.000 | 3 gr. 69 |

De ces deux expériences, on peut conclure à l'inexistence d'une action favorisante de petites quantités d'acide borique sur l'*Aspergillus niger*. La dose empêchante semble assez élevée, puisque dans des liquides contenant 1 gramme par litre d'acide borique, les cultures ne sont pas notablement plus mauvaises qu'en l'absence de ce corps. L'expérience suivante montre, en effet, que ce n'est guère qu'à partir de 5 grammes par litre que se fait sentir l'action défavorable ; ce n'est que dans des liquides à saturation qu'on observe un arrêt absolu de la vie de l'*Aspergillus*.

| Acide borique en millionièmes | Poids moyen de récolte après 4 jours |
|---|---|
| 0 | 4 gr. 23 |
| 1.000 | 4 gr. 07 |
| 5.000 | 3 gr. 05 |
| 10.000 | 2 gr. 37 |
| 20.000 | pas de mycélium développé. |
| 40.000 | |

Pour la dose de 20.000, le développement commence seulement après une dizaine de jours ; après 25 jours de culture, on a pu recueillir pour cette série des mycéliums d'un poids moyen de 2 gr. 12. Après 25 jours, la série à 40 grammes par litre ne présente pas trace de développement.

J'ai fait une expérience avec des doses intermédiaires entre 10 et 20 grammes par litre :

| | | |
|---|---|---|
| 10 gr.<br>12 gr. 5<br>15 gr. | après 4 jours,<br>développement<br>par place. | après 8 jours,<br>développement général,<br>décroissant comme croît |
| 17 gr. 5 | pas de dévelop. | la teneur en acide borique. |

Ainsi, *nulle part dans mes expériences sur les organismes inférieurs* : levure, ferment lactique, « Aspergillus niger », *je n'ai pu voir d'influence favorisante nette pour de petites doses de bore*. L'*Aspergillus*, de beaucoup le plus sensible des organismes étudiés, ne réagit nullement au bore.

*Quant aux doses toxiques, elles sont très élevées :* il faut 5 grammes par litre pour empêcher la coagulation du lait par le bacille lactique ; 10 grammes par litre pour empêcher le développement de la levure ; et ce n'est qu'en solution à 40 grammes par litre que tout développement de l'*Aspergillus niger* semble empêché.

Jusqu'ici, le bore paraît un élément de peu d'intérêt. Nous allons voir qu'il n'en est plus de même si l'on s'adresse aux végétaux supérieurs.

## CHAPITRE II

### ACTION DU BORE SUR LES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS

L'action des composés du bore sur la croissance des végétaux supérieurs n'a guère été étudiée qu'en ce qui concerne leur toxicité. Dès 1850, Peligot (1) arrose une seule fois des plants de haricots avec des solutions d'acide borique et de borax à 2 grammes par litre ; ils constate que les plantes jaunissent, puis meurent. J. Morel (2), en 1892, fait tremper pendant six heures des graines de haricot dans des solutions contenant 1, 2, 5 et 10 grammes par litre d'acide borique et les met ensuite à germer sur du sable humide. Les graines trempées dans les solutions à 1 et 2 millièmes germent comme les graines témoins trempées dans l'eau pure ; celles des deux autres essais éprouvent un retard de trois jours environ, pour 5 grammes par litre, de plus de six jours pour 10 grammes.

Mis en terre, les plants font apparaître leurs cotylédons hors du sol le troisième jour pour la plus faible dose et seulement plus de huit jours après pour la plus forte dose. Morel a suivi le premier développement des plants et constate qu'ils sont jaunâtres et étiolées pour les graines trempées dans les solutions de 5 et 10 pour 1.000. De ces observations il ressort que l'acide borique exerce une action inhibitrice sur la ger-

1. *B. Soc. chim.* ; t. XXVII, p. 517, 1850.
2. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXIV, p. 131, 1892.

mination et la première croissance des plantes pour des doses élevées.

Seul un auteur japonais, Nakamura, semble s'être préoccupé d'une action favorisante possible des petites doses d'acide borique. Je n'ai malheureusement pas pu avoir en mains le travail de cet auteur que cite Micheels (1).

### § Ier — Action de l'acide borique sur la germination

Pendant la germination, la vie de la plante est très rapprochée de la vie animale ou de celle des végétaux inférieurs : elle utilise des réserves toutes faites de matière organique pour l'élaboration de ses tissus ; elle vit sur des matériaux organiques. Elle devient ensuite capable d'assimiler par elle-même directement l'azote minéral et le carbone de l'acide carbonique : elle accomplit alors la synthèse des matières nécessaires à son existence à partir d'éléments purement minéraux. A ce moment-là, elle mène une vie qui est tout à fait particulière aux végétaux verts. Les éléments qui sont utiles à l'un de ces deux genres de vie ne le sont peut être pas à l'autre. J'ai donc tout d'abord essayé de chercher si de petites doses d'acide borique étaient utiles à la germination.

*Première expérience.* — J'ai recommencé l'expérience de Morel en opérant avec des grains de blé au lieu de graines de haricots.

Des lots de 10 grains de blé sont mis à tremper dans des solutions d'acide borique à 0gr.1, 1 ,5, 10 et 30 grammes par litre ; un lot témoin est mis en même temps dans l'eau distillée. Après six heures, on transporte les graines sur du sable humide. Pour le lot témoin et les lots trempés dans des solu-

1. Voici la référence que j'ai trouvée du travail : Nakamura. « Can boric acid exert any stimulant action on plants ». *Bull. College of Agriculture* (Tokyo).

tions d'acide borique au-dessous de 5 pour 1.000, la germination marche avec la même rapidité : 8 grains sur 10 sont germés après deux jours. Elle est sensiblement ralentie pour les doses supérieures. Au bout de trois jours, la moitié seulement des graines a commencé à germer pour les doses de 10 et 30 gr. par litre. L'action toxique semble porter particulièrement sur les radicelles. Les graines trempées dans l'acide borique à 30 gr. par litre ont toutes germé au bout de six jours, mais alors qu'elles présentent de petites tigelles bien développées, les radicelles sont à peine visibles. Je crois que cette particularité est due, dans le cas du blé, à la disposition anatomique de la graine : les enveloppes protectrices de l'embryon présentent une partie très fragile, justement l'endroit qui recouvre la radicelle ; celle-ci est la première touchée par la solution toxique, car son gonflement seul suffit à crever la petite enveloppe à cet endroit. J'ai pu observer sur des graines stérilisées au sublimé le même phénomène ; j'ai vu certains plants, provenant de graines ainsi stérilisées, atteindre 10 cm. de tige sans avoir développé de racine dépassant 2 millimètres.

J'ai abandonné après cette expérience la technique de Morel, qui ne permet pas de connaître la quantité absolue d'acide borique dont la présence dans le milieu favorise ou empêche la germination : on ne sait pas ce que la graine a pu absorber d'acide borique pendant les six heures de séjour dans les solutions. J'ai préféré faire des germinations dans des milieux où la teneur en acide borique restait constante pendant toute la durée de l'expérience.

*Deuxième expérience.* — Neuf coupelles de porcelaine contenant chacune 500 grammes de sable fin (sable de Fontainebleau lavé à l'acide chlorhydrique), sont arrosées avec 100 cc. d'eau distillée contenant des quantités croissantes d'acide borique pour la série I ou de borate de soude pour la série II. Les doses employées en acide borique sont 0, 10, 100, 1.000, 10.000 milligrammes par litre de liquide d'imbibition.

On sème 20 graines de blé choisies dans chaque coupelle. Jusqu'aux doses de 100 milligrammes, la germination a lieu en même temps que pour le témoin sans acide borique. Les plants ont une longueur de 10 cm. environ au bout de quinze jours : pas d'action favorisante visible. Les plants à 100 milligrammes paraissent nettement jaunâtres : c'est un début d'action toxique ; elle porte très rapidement sur la formation de la chlorophylle. Pour les doses de 1.000 milligrammes, la germination est retardée d'une dizaine de jours ; pour celles de 10.000 milligrammes il n'y a pas trace de germination après quinze jours.

*Troisième expérience.* — Une nouvelle expérience est faite dans les mêmes conditions avec des doses d'acide borique de 0,5, 10, 50, 100, 500, 1.000, 5.000 milligrammes par litre de liquide d'imbibition. La graine employée est le blé.

Pour les doses jusqu'à 100 milligrammes, la germination va comme le témoin, sans action favorisante visible.

Pour 500 milligrammes on observe un retard de trois ou quatre jours, pour 1.000 un retard de dix jours ; après seize jours les plants de cette dernière dose n'ont qu'un centimètre de hauteur. Pour 5.000, aucune germination.

Ainsi, pour le blé on n'a pu voir aucune action favorisante de petites doses d'acide borique. L'action toxique commence au-dessus de 100 milligrammes par litre de liquide; elle est absolue pour 5 grammes par litre.

*Quatrième expérience.* — Même technique. Graine employée : le pois.

Doses d'acide borique : 0, 25, 250, 2.500, 5.000 milligrammes par litre de liquide d'imbibition.

Jusqu'à 250, germination comme le témoin, les plants de la dose de 250 milligrammes sont nettement plus jaunes que pour la dose de 25 et le témoin.

Pour la dose de 2 gr. 5 une graine seulement a germé, donnant une tigelle jaunâtre qui meurt presque aussitôt.

Ici encore pas d'action favorisante. Aucune germination avec 5 grammes par litre.

La conclusion de ces expériences pour le sujet qui nous intéresse plus particulièrement est la suivante :

*Nous n'avons pas pu observer d'action favorisante de l'acide borique ou des borates aux petites doses sur la germination des plantes.*

### FONCTIONNEMENT DE LA MEMBRANE HÉMIPERMÉABLE DES GRAMINÉES VIS-A-VIS DE L'ACIDE BORIQUE

Il m'a semblé intéressant de rechercher, pour compléter l'étude de l'acide borique sur la germination, si cet acide pénètre à l'intérieur de l'endosperme des Graminées. Adrian J. Brown (1) a démontré l'existence d'une membrane semi-perméable entourant les graines de certaines plantes de cette famille. J'ai renouvelé sur le blé, le seigle, l'orge et l'avoine les expériences de Brown en ce qui concerne le passage des acides. J'ai comme lui constaté que les enveloppes de l'orge et de l'avoine ne laissent pas passer l'acide sulfurique.

Pour les graines nues, comme le blé et le seigle, l'acide atteint l'embryon mais ne pénètre pas dans l'endosperme. J'ai dit plus haut en effet que dans ces graines le gonflement seul suffisait à crever l'enveloppe qui protège la radicelle.

En ce qui concerne l'acide borique j'ai pu constater les mêmes phénomènes que pour l'acide sulfurique. Les graines sont mises à tremper pendant 24 heures dans une solution d'acide borique à 30 grammes par litre. On les lave à l'eau et on y fait des coupes épaisses. Ces coupes sont passées rapidement dans la teinture alcoolique de curcuma ; on lave à l'alcool pour enlever l'excès de teinture ; on laisse tremper les coupes pendant quelques minutes dans l'acide chlorhydrique au dixième et on les fait ensuite sécher à l'étuve à 35° sur une lamelle de verre. Les parties où a passé l'acide borique se

1. *Annals of Botany*, t. XXI, n. 81, janvier 1907.

colorent en rouge vif; les parties non boriquées restent jaunes. Par passage dans l'ammoniaque au dixième, les parties boriquées rouges passent au bleu. On voit de la sorte que sur le seigle et le blé, les téguments et l'embryon sont seuls imprégnés d'acide borique; l'endosperme n'en renferme pas dans les conditions normales. Au contraire, si avant le trempage on a lésé les téguments qui entourent l'endosperme, il se colore en rouge vif par le curcuma. J'arrive ainsi pour l'acide borique aux mêmes conclusions que Brown pour d'autres acides.

*La membrane entourant l'endosperme agit vis-à-vis de l'acide borique comme une membrane hémiperméable.*

Pour l'orge et l'avoine, l'embryon lui-même n'est pas touché par l'acide borique au bout de 24 heures de trempage.

### § II. — **Action sur la croissance des végétaux supérieurs. Emploi de la méthode synthétique**

Les expériences que j'exposerai dans ce paragraphe ont été faites dans des milieux entièrement synthétiques, de composition connue; on peut les classer en deux séries : la première comporte les expériences faites en milieu liquide stérile par conséquent à l'abri des influences que peuvent exercer les microorganismes sur les cultures; la seconde comporte des expériences faites sur du sable arrosé d'une solution nutritive.

#### 1° CULTURES EN MILIEU LIQUIDE STÉRILE

Il est indispensable pour se rendre compte de l'action d'un élément sur les végétaux d'opérer dans les conditions les plus rigoureuses; ce sont les expériences en milieu liquide qui les réalisent le mieux :

1° Le milieu liquide peut être de composition exactement connue; les sels employés sont vérifiés exempts de l'élément à étudier.

2° On peut opérer en milieu aseptique.

Cette dernière précaution n'est pas la moins difficile.

La *stérilisation des graines* est peu commode et donne lieu à de nombreux déchets dans l'expérience, soit que la stérilisation n'ait pas été complète, soit que la graine ait été tuée par cette opération. Le procédé employé est le suivant : la graine est plongée pendant cinq minutes dans une solution alcoolique de sublimé à 1 o/o, puis dans une solution aqueuse de sublimé à la même concentration ; on lave ensuite rapidement dans de l'acide chlorhydrique à 1 o/o et à trois ou quatre reprises dans l'eau distillée stérilisée. Les cas d'infection sont assez rares dans ces conditions, mais un certain nombre de graines ne germent pas ou germent avec un retard assez grand pour qu'elles soient à éliminer de la série ; comme chacun des flacons employés dans ces expériences ne contient qu'un plant, il faut en préparer une très grande quantité pour obtenir une expérience bien complète et tabler sur des moyennes de plusieurs plants pour une même dose de bore de façon à éliminer autant que possible les erreurs individuelles, et une expérience dans ces conditions devient de la sorte un gros travail.

Le dispositif des flacons employés a déjà été minutieusement décrit dans la thèse de Javillier. Dans l'expérience qui va suivre, où la plante expérimentale était le blé, j'ai employé des flacons d'une contenance de 500 cc. Ce sont des flacons à fond plat, en verre vert mince, pouvant aller à l'autoclave. Leur col, large, porte un bouchon de liège plat, perforé de deux trous : l'un de 1 cm. 5 de diamètre est traversé d'un tube de verre de 7 à 8 cm. de longueur, l'autre livre passage à un tube de petit diamètre allant au fond du flacon, recourbé en siphon à l'extérieur et fermé d'une petite baguette de verre ; c'est ce dernier qui permet de renouveler le liquide nutritif ou de mettre de l'eau dans le flacon quand il s'en est par trop évaporé à l'aide d'une pissette stérilisable qu'on peut adapter au siphon. Le tube large de 7 à 8 cm. de long est fermé à l'intérieur du flacon par un diaphragme en gaze sur lequel on projettera la graine ; celle-ci se trouvera de la sorte en atmosphère humide, sans toutefois plonger dans l'eau,

et les racines n'éprouveront aucune difficulté à traverser le réseau de gaze (le dispositif est assez nettement visible sur les flacons de la planche I).

Dans chaque flacon on introduit 500 cc. de liquide de culture. Voici la formule du liquide employé :

| | Gramme | | Gramme |
|---|---|---|---|
| Nitrate de calcium . . . . | 0,509, correspondant à 0,100 de calcium | | |
| — d'ammoniaque. . . | 0,500 | | |
| Phosphate acide de potassium. . . . . | 0,697 | — | 0,200 de potassium |
| Sulfate de magnésium . . | 0,506 | — | 0,050 de magnésium |
| Alun de potasse. . . . . | 0,100 | — | 0,005 d'aluminium |
| Sulfate de fer ammoniacal. | 0,0175 | — | 0,001 de fer |
| — de manganèse. . . | 0,004 | — | 0,001 de manganèse |
| Chlorure de sodium. . . . | 0,050 | — | 0,020 de sodium |
| Iodure de potassium . . . | 0,001 | | |
| Silicate de potassium . . . | 0,100 | | |
| Sulfate de zinc . . . . . | 0,001 | | |
| Eau distillée Q. S. p. 1.000. | | | |

On ajoute à ceux des flacons qui doivent contenir du bore une certaine quantité d'acide borique correspondant à la dose de bore à étudier et on stérilise à 115° pendant une demi-heure. Le bouchon de liège est solidement maintenu par un fil de cuivre noué au-dessous de la bague du col. Le tube large, qui est fixé dans le plus grand des trous du bouchon, est surmonté d'un tube de diamètre un peu supérieur ; ce tube, long de 15 centimètres, est maintenu autour du premier par de l'ouate et fermé d'un tampon de coton à son extrémité libre. Après stérilisation et refroidissement des flacons ainsi montés et remplis, on paraffine les bouchons de liège, fermant ainsi hermétiquement l'embouchure et on sème les graines.

D'une main on soulève le tampon de ouate qui ferme l'extrémité libre du grand tube, de l'autre, à l'aide d'une pince flambée, on projette dans le tube une graine stérilisée ; elle vient tomber sur le petit diaphragme de gaze. On met à germer dans une chambre thermostat réglée à 22°. Comme je l'ai dit, on prépare pour chaque dose de bore plusieurs flacons, d'une part, de façon à prévoir les infections possibles et les

cas de non-germanisation, d'autre part, pour faire porter les observations dans chaque série sur un certain nombre de plants.

Une fois les graines germées, on porte les flacons à la lumière après les avoir placés dans des boîtes en carton, pour empêcher l'éclairage des racines ; l'emploi de boîtes a l'avantage de permettre à chaque instant de voir l'état du liquide de culture et la totalité de la plante.

Lorsque la partie aérienne de la plante a poussé jusqu'à toucher l'ouate qui ferme le tube mis en dernier lieu, on enlève ce tube et on fixe la tige dans le tube inférieur à l'aide de tampons de ouate stérilisée qui empêchent toute communication septique du vase et de son contenu avec l'extérieur. Il est, dans ces conditions, possible de pousser les cultures jusqu'à fructification. De temps en temps on remplace l'eau évaporée par de l'eau stérile à l'aide du siphon.

Je n'ai fait d'expérience complète qu'avec le blé : cette graine, dénudée, se prête bien à la stérilisation. J'avais essayé de stériliser du sarrazin, du chanvre, du radis ; mais ces graines sont à peu près instérilisables si on ne leur enlève l'enveloppe extérieure ; si on leur enlève celle-ci, elles deviennent alors trop fragiles. Le pois se stérilise très bien, malheureusement on ne peut le cultiver dans ces conditions : la germination est normale, la tige grandit, mais les feuilles ne se développent pas et la plante meurt subitement et se dessèche en quelques jours. Malgré les nitrates présents dans la solution, la symbiose bactérienne semble nécessaire à cette légumineuse.

J'ai donc fait au printemps 1907, avec du blé (variété Pétanille blanche, blé hybride Galand fourni par Vilmorin), une expérience portant sur des doses de 0,1 à 500 milligrammes de *bore* par litre ajouté au liquide nutritif.

L'ensemencement a été opéré le 1er mai. L'expérience dut être arrêtée le 27 juin à cause de l'apparition sur quelques feuilles de mes plants de l'*Erisiphe graminis*. Les plantes cultivées en milieu artificiel présentent une résistance très fai-

ble aux maladies parasitaires. La culture avait donc duré 58 jours.

Les plants récoltés sont lavés à l'eau distillée et séchés à 100°. Les poids sont pris frais et secs pour les organes séparés : racines et organes aériens. Le tableau ci-dessous donne les résultats de cette expérience. Les poids sont des moyennes de trois ou quatre plants poussés dans des conditions normales,

| Bore en milligrammes par litre de liquide nutritif | Poids moyen d'un plant | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | frais | | | sec | | |
| | racine | tige | total | racine | tige | total |
| I. 0. . . . . | 1,11 | 4,04 | 5,15 | 0,099 | 0,657 | 0,756 |
| II. 0,1 . . . . . | 1,06 | 3,48 | 4,54 | 0,099 | 0,557 | 0,656 |
| III. 0,5 . . . . . | 1,19 | 4,37 | 5,56 | 0,114 | 0,663 | 0,777 |
| IV. 1. . . . . | 1,33 | 4,13 | 5,46 | 0,099 | 0,674 | 0,773 |
| V. 2,5 . . . . . | 2,29 | 5,05 | 7,34 | 0,155 | 0,742 | 0,897 |
| VI. 5. . . . . | 1,79 | 5,27 | 7,06 | 0,151 | 0,845 | 0,916 |
| VII. 10. . . . . | 1,61 | 5,68 | 7,29 | 0,160 | 0,900 | 1,060 |
| VIII. 20 . . . . . | 0,94 | 2,93 | 3,87 | 0,085 | 0,524 | 0,609 |
| IX. 50 . . . . . | 0,50 | 1,60 | 2,10 | 0,042 | 0,319 | 0,361 |
| X. 100 . . . . . | 0,03 | 0,20 | 0,23 | 0,004 | 0,055 | 0,059 |
| XI 200. . . . . | germ. avec un retard | | | de 10 jours | | et meurent |
| XII. 500 . . . . . | | | | de 17 jours | | |

c'est-à-dire germés sans retard sur la masse des autres de la même série et n'ayant subi aucun accident d'infection pendant le cours de leur culture.

La planche I donne l'aspect de l'expérience avec un plant

de chaque série, jusqu'à VIII. Les V et VI apparaissent nettement plus beaux (1).

De l'examen du tableau ressort nettement l'existence d'une influence favorisante de petites doses de bore et d'un maximum entre les doses de 2,5 (V) et 10 (VII) milligrammes par litre. Les augmentations du poids des récoltes totales par rapport à la série témoin sont respectivement pour les séries :

| | Augmentation o/o poids frais | Augmentation o/o poids sec |
|---|---|---|
| V. . . . . | 42 o/o | 18 o/o |
| VI . . . . | 37 o/o | 34 o/o |
| VII . . . . | 41 o/o | 40 o/o |

Les augmentations en poids sec ne correspondent pas exactement aux augmentations de poids frais et nous verrons souvent le même fait se produire. Les poids frais sont en réalité fort sujets à caution et c'est sur le poids sec qu'il faut toujours tabler les conclusions.

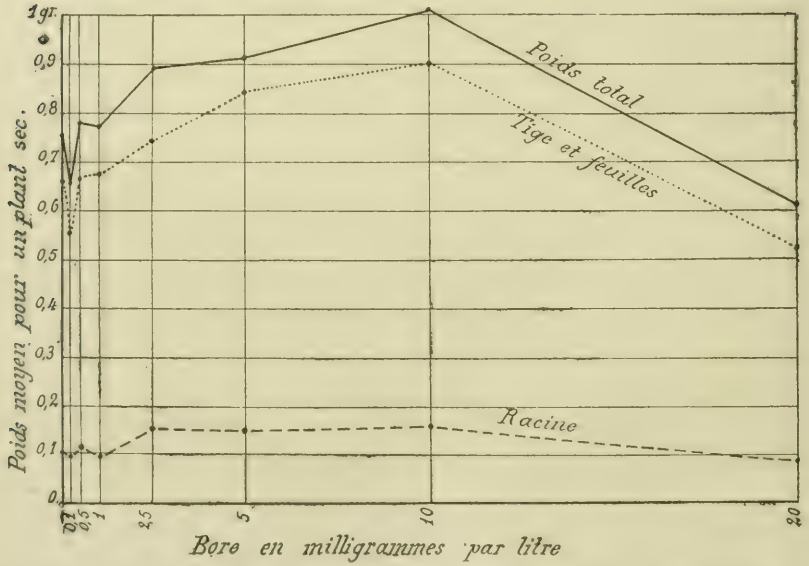



Fig. 3. — Courbes de l'action du bore sur la croissance du blé en milieu liquide.

1. J'adresse mes remerciements à M. Jeantet auquel je dois les planches photographiques de ce travail.

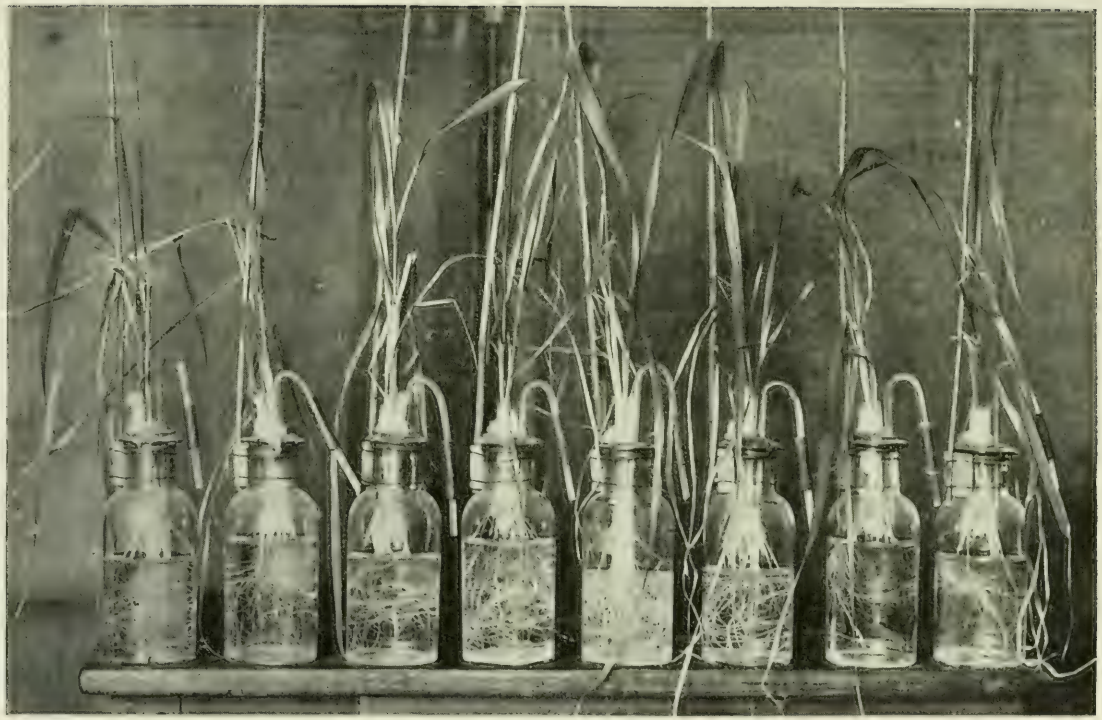


Planche I. — Culture de blé en milieu liquide stérile.

*Les doses de bore vont en croissant de gauche à droite.*

Les courbes données par les poids secs des récoltes sont figurées ci-dessus (page 94) :

Elles apparaissent nettement ascendantes jusqu'à un maximum atteint pour la dose de 10 milligrammes par litre, puis décroissent rapidement. Au delà de 100 milligrammes par litre, la vie semble impossible pour la plante. L'action toxique de l'acide borique semble à la fois porter sur la formation de la chlorophylle, les plants poussés dans des doses dépassant 10 milligrammes pour mille sont jaunâtres, et sur la croissance des racines. Le rapport de la tige à la racine qui est de 6 pour la série témoin et pour les séries peu riches en bore monte à 7, puis à 13 pour les séries de 50 et 100 mgr. de bore pour mille.

Pour les doses favorables, la racine paraît aussi favorisée particulièrement : le rapport $\frac{\text{tige}}{\text{racine}}$ tombe à 5.

De fait, à la simple observation visuelle, les racines des plants borés à 5 et 10 milligrammes o/oo, sont plus longues que les autres ; il est vrai de dire qu'elles sont moins riches en racines adventives ; nous observerons le même fait à propos d'autres cultures.

Les résultats favorables obtenus dans cette expérience m'ont poussé à entreprendre de nouvelles recherches avec un certain nombre d'espèces végétales. L'emploi de cette technique a été alors abandonné comme demandant trop de temps. Il m'a paru plus intéressant, étant donné que les augmentations obtenues dépassaient 30 o/o, de faire un plus grand nombre d'essais dans des conditions moins précises. L'intervention des bactéries m'a paru de peu d'importance.

### 2° CULTURES SUR SABLE

Les pots employés sont des pots de terre paraffinés ; la précaution qui consiste à paraffiner les pots est en effet indispensable bien qu'elle puisse nuire aux cultures en empêchant l'aération ; la terre des pots est en effet de composition incon-

nue et les racines des plantes pourraient aller chercher à leur surface des éléments autres que les éléments qu'on désire introduire dans le milieu.

Le sable dont je me suis servi est le sable appelé grès de Nemours, sable siliceux très pur employé dans la fabrication des verres d'optique (1). Ce sable est lavé à plusieurs reprises avec de l'acide chlorhydrique, puis avec de l'eau qui a été distillée dans un appareil entièrement en verre. On le calcine au moufle pour terminer.

Dans chaque pot on met 2 kgr. de ce sable. On sème vingt graines de la plante à étudier et on mouille le sable avec 500 cc. du liquide nutritif employé précédemment pour les cultures en milieu liquide. On fait un pot témoin sans bore et des pots renfermant des doses croissantes de cet élément à l'état d'acide borique. On maintient une humidité d'environ 10 o/o dans les pots en les arrosant avec de l'eau distillée. Chaque pot a été préalablement taré avec son contenu et une simple pesée permet de se rendre compte de l'état d'humidité des pots et de ramener tous ceux d'une même série à la même teneur en eau. Les plants récoltés sont pesés frais, puis après dessiccation à 100°.

Entrons maintenant dans le détail des cultures :

Blé (blé Chiddam de mars). — On sème 20 graines dans des pots contenant respectivement 0, 0,05, 0,5, 5 et 25 milligrammes de bore, soit 0, 0,1, 1, 10 et 50 milligrammes par litre de liquide nutritif.

L'ensemencement est fait le 15 février 1909. Après 12 jours, les quatre premiers pots ont bien poussé, présentant des plants de 6 à 8 cm. de longueur, bien verts. Le pot le plus riche en bore ne présente que des plants à feuille jaune, pigmentée de rouge à l'extrémité et dont le plus grand a 3 cm.

1. Je remercie M. Verneuil, professeur au Conservatoire national des Arts et Métiers, et M. Parra, maître de verrerie d'optique, à l'obligeance desquels je dois d'avoir pu me procurer quelques sacs de ce sable recueilli dans des conditions tout à fait particulières de pureté.

On arrache un certain nombre de plants pour ramener leur nombre à 10 par pot.

Les plants enlevés au pot contenant 5 milligrammes de bore ont des racines très allongées et grêles, deux fois plus longues à égalité de longueur de tige que celles des plants du pot témoin.

On récolte les plants le 20 mai : ceux du pot le plus riche en bore sont morts après avoir atteint 10 cm. environ. Le tableau suivant donne les poids frais et secs des plants récoltés :

| Teneur des pots en milligrammes de bore | Poids moyen d'un plant | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Frais | Augmentation o/o | Sec | Augmentation o/o |
| — | — | — | — | — |
| 0 | 0,31 | | 0,066 | |
| 0,05 | 0,39 | 25 | 0,071 | 7,5 |
| 0,5 | 0,29 | | 0,060 | |
| 5 | 0,24 | | 0,060 | |
| 25 | morts | | | |

Ces cultures ont été faites en d'assez mauvaises conditions ; elles ont dû à cause du mauvais temps être gardées en serre pendant toute leur durée, avec un assez mauvais éclairage.

Le 28 mai, sur ces mêmes pots, après une nouvelle addition de solution nutritive, sans nouvelle addition de bore, on sème 20 graines de blé. Le 14 juin, on ramène à 10 plants par pot. La récolte est faite le 17 juillet. On observe à la récolte que les racines des plants témoins sont moins développées que celles des plants à 0 mgr. 05 et 0 mgr. 5 de bore.

| Teneur en bore | Poids moyen d'un plant | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Frais | Augmentation o/o | Sec | Augmentation o/o |
| — | — | — | — | — |
| 0 | 0,327 | | 0,062 | |
| 0,05 | 0,418 | 17 | 0,087 | 40 |
| 0,5 | 0,387 | 8 | 0,085 | 37 |
| 5 | 0,320 | | 0,063 | |
| 25 | 0,135 | | 0,035 | |

Les augmentations en poids sec sont très belles dans le cas de cette culture faite à très bonne époque. Dans les premières cultures le bore a été absorbé en partie : nous voyons que la plante ne meurt pas pour la plus forte dose et l'action favorisante s'observe pour la dose de 0 mgr. 5, alors qu'elle était indifférente à la première culture.

Les doses favorisantes sont, dans ces expériences sur le sable, plus faibles que dans les expériences en milieu liquide. En tenant compte de l'humidité maintenue (10 0/0) nos concentrations en bore sont en réalité 0,25 ; 2,5 , 25 et 125 milligrammes par litre de liquide. Il faut de plus tenir compte que l'évaporation augmente la concentration des sels à la surface. En pleine terre, l'évaporation ne se faisant pas de la même façon et, de plus, l'acide borique se trouvant fixé à l'état de borate de chaux, puisqu'il déplace l'acide carbonique, nous verrons les doses favorables s'élever.

Avoine (Avoine noire de Hongrie). — Quatre pots contenant respectivement 0, 0,05, 0,5 et 5 milligrammes de bore sont ensemencés de 20 graines d'avoine le 26 mars. Après germination on ramène à 10 le nombre des plants par pot. La récolte est faite le 30 juin : un certain nombre de plants présentent un petit épi bien formé mais non encore mûr.

| Teneur en bore des pots | Poids moyen d'un plant | | | |
|---|---|---|---|---|
| | frais | augmentation | sec | augmentation |
| — | — | — | — | — |
| 0 | 1,070 | | 0,176 | |
| 0,05 | 1,222 | 14,2 0/0 | 0,280 | 59.0 0/0 |
| 0,5 | 1,345 | 25,0 » | 0,205 | 16,4 » |
| 5 | 0,750 | | 0,120 | |

Les augmentations sont notables. L'influence favorisante est encore plus grande que pour le blé. Nous verrons d'ailleurs que certaines plantes sont plus sensibles que d'autres à l'influence du bore.

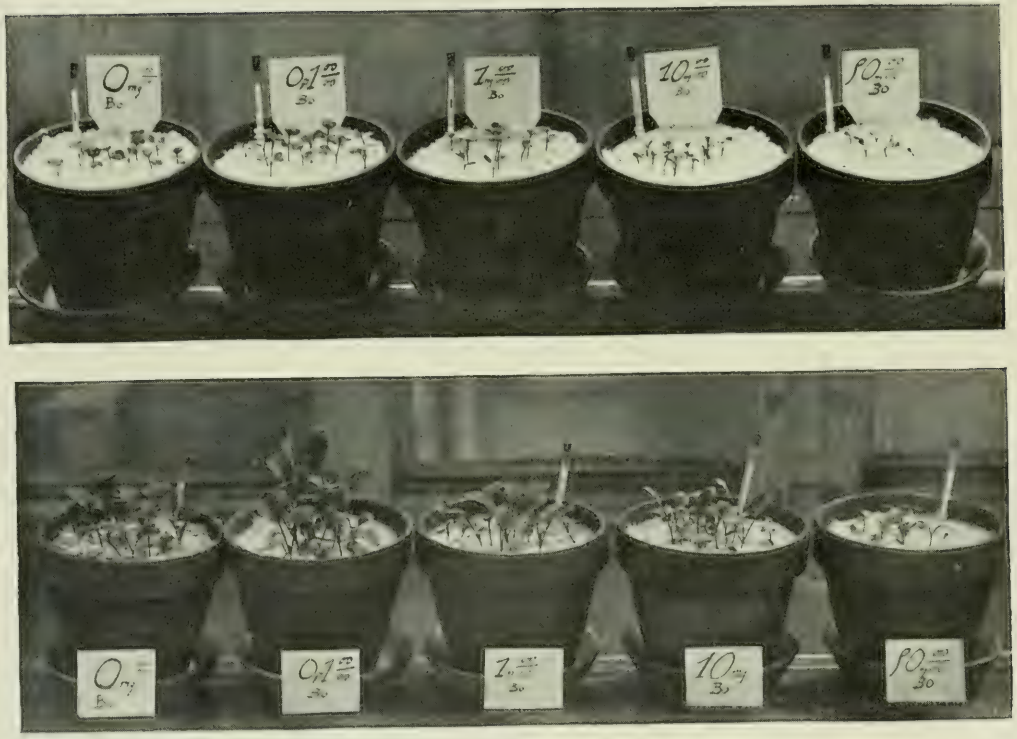


Planche II. — Culture de radis sur sable.

*En haut : culture de 11 jours. | En bas : culture de 32 jours.*

Radis (Rond, rose à forcer, Vilmorin). — Le radis est une plante qui se prête parfaitement aux cultures d'essai à cause de la rapidité de sa croissance : il est récoltable au bout de un mois environ, dans de bonnes conditions de culture, et il permet, pouvant être semé à toute époque, d'obtenir dans la saison un assez grand nombre d'expériences.

La première série sur sable fut ensemencée le 9 avril.

On laisse après la germination 12 graines par pot.

Une photographie prise le 20 avril (planche II) montre l'aspect des plants jeunes. Le pot contenant 0,1 o/oo de bore, c'est-à-dire 0,05 quantité absolue pour le pot, paraît déjà favorablement influencé. L'action paraît très nettement sur la seconde photographie prise le 11 mai.

La récolte est faite le 21 mai.

Voici les poids respectifs moyens obtenus pour un plant ; la culture a été faite entièrement en serre.

| Bore en milligrammes | | Poids moyen d'un plant | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| par litre de liquide nutritif | par pot | frais | augmentation | sec | augmentation |
| — | — | — | — | — | — |
| 0 | 0 | 0,360 | | 0,052 | |
| 0,1 | 0,05 | 0,580 | 61 o/o | 0,057 | 9,6 o/o |
| 1 | 0,5 | 0,427 | 18,6 » | 0,052 | |
| 10 | 5 | 0,356 | | 0,033 | |
| 50 | 25 | 0,126 | | 0,024 | |

On remarquera l'énorme augmentation en poids frais pour une petite augmentation de poids sec ; nous avons déjà vu le phénomène pour la première culture de blé sur sable.

Une seconde culture est faite sur quatre des mêmes pots après une nouvelle addition de liquide nutritif, sans addition de bore.

L'ensemencement est fait le 28 mai. La culture est faite en plein air, condition plus favorable que pour la précédente expérience.

Récolte le 5 juillet.

| Bore par pot en milligr. | Poids moyen pour un plant *frais* — tige et feuilles | racines | total | augmentation pour le poids total |
|---|---|---|---|---|
| — | — | — | — | — |
| 0 | 0,590 | 0,407 | 0,997 | |
| 0,05 | 0,512 | 0,589 | 1,101 | 10 0/0 |
| 0,5 | 0,730 | 0,756 | 1,486 | 49 » |
| 25 | 0,480 | 0,430 | 0,910 | |

| Bore par pot en milligr. | Poids moyen d'un plant *sec* — tige et feuilles | racines | total | augmentation |
|---|---|---|---|---|
| — | — | — | — | — |
| 0 | 0,076 | 0,060 | 0,136 | |
| 0,05 | 0,083 | 0,107 | 0,190 | 39,7 0/0 |
| 0,5 | 0,086 | 0,084 | 0,170 | 25,0 » |
| 25 | 0,062 | 0,040 | 0,102 | |

L'augmentation est très nette, tant en poids sec qu'en poids frais.

Ainsi, sur trois plantes différentes, blé, avoine et radis, nous avons pu noter, en nous servant d'un milieu solide purement synthétique, le phénomène observé sur les cultures en milieu liquide : existence d'une courbe de l'action du bore présentant un optimum très net pour les petites doses.

### § III. — Expériences complémentaires : emploi de la terre arable.

Deux séries d'expériences complémentaires ont été faites, ayant pour but d'étudier l'influence de l'addition de bore aux sols naturels sur les cultures. Là, la composition du milieu n'est pas entièrement connue et il renferme déjà certainement des traces du corps qu'on étudie.

Les cultures en terre ont été faites, soit sur un volume de terre limité, additionné d'une quantité connue de bore (expé-

Planche III. — Culture de maïs (2 mois).

riences en pots), soit directement en pleine terre, le bore étant ajouté comme engrais à certaines portions de terrain.

### 1° Expériences en pots

1.200 grammes de terre ordinaire, tamisée, non fumée, sont mis dans des pots paraffinés et le premier arrosage est fait avec de l'eau contenant en solution des doses connues d'acide borique. Les arrosages sont ensuite faits à l'eau distillée pure. Les pots sont tarés et la terre est maintenue à un égal degré d'humidité pour ceux d'une même série.

Maïs. — Le 26 avril 1909 on sème dans cinq pots 8 graines de maïs bien choisies par pot. On arrose avec des doses respectives de 0, 1, 5, 10, 50 milligrammes de bore à l'état d'acide borique. On laisse après la germination les deux plants les mieux développés de chaque pot. Durant toute la durée de la culture, on peut observer que les pots contenant 1 et 5 milligrammes de bore sont plus beaux que les autres : une photographie (planche III) prise le 22 juin montre nettement la différence des plants de ces deux doses, d'une part avec le témoin sans bore, d'autre part avec les doses trop élevées. La récolte a lieu le 22 juin ; la quantité de terre des pots n'étant pas suffisante pour poursuivre la culture beaucoup plus loin, les plants commencent à s'étioler : la culture a été faite entièrement en serre.

| Bore en milligr. par pot | Poids moyen d'un plant | | | |
|---|---|---|---|---|
| | frais | augmentation | sec | augmentation |
| — | — | — | — | — |
| 0 | 7,06 | | 0,740 | |
| 1 | 8,11 | 14,8 o/o | 0,765 | 3,4 o/o |
| 5 | 8,00 | 13,3 » | 0,805 | 8,8 » |
| 10 | 6,02 | | 0,650 | |
| 50 | 5,20 | | 0,510 | |

Les augmentations en poids frais sont plus considérables qu'en poids sec.

Radis. — Cinq pots additionnés respectivement de 0, 0,05, 0,5, 5, et 25 milligrammes de bore sont ensemencés le 26 avril. La récolte, faite le 14 juin, donne les résultats suivants :

| Bore en millig. par pot | Poids moyen d'un plant *frais* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Racines | Feuilles et tige | Total | Augmentation |
| — | — | — | — | — |
| 0 | 1,608 | 1,428 | 3,036 | |
| 0,05 | 1,670 | 1,372 | 3,042 | 0,19 o/o |
| 0,5 | 1,636 | 1,641 | 3,277 | 7,93 » |
| 5 | 1,672 | 1,609 | 3,281 | 8,06 » |
| 25 | 1,566 | 1,321 | 2,887 | |
| | Poids moyen d'un plant *sec* | | | |
| 0 | 0,106 | 0,142 | 0,248 | |
| 0,05 | 0,122 | 0,141 | 0,263 | 6,04 o/o |
| 0,5 | 0,120 | 0,162 | 0,282 | 13,70 » |
| 5 | 0,114 | 0,157 | 0,271 | 9,27 » |
| 25 | 0,115 | 0,131 | 0,249 | |

Si nous comparons cette culture avec les cultures en milieu synthétique, nous voyons que l'action favorisante se fait sentir pour des doses plus élevées qu'en milieu artificiel et que la culture a encore de très bons rendements en présence de doses déjà très toxiques dans les cultures sur sable. L'évaporation ne se fait pas aussi rapidement dans la terre que dans le sable, il en résulte qu'on n'a pas vers la surface du pot une couche de solution concentrée comparable à celle qui se produit dans le cas du sable ; de plus l'acide borique doit se fixer en terre à l'état de composé insoluble, probablement de borate de chaux ; l'action toxique est ainsi en partie annihilée, et par leurs racines les plantes ne puisent de bore que les quantités favorables.

Cresson alénois. — On sème dans de petites cuvettes en porcelaine émaillée, contenant 400 grammes de terre, trente graines de cresson alénois, le 20 avril. On additionne de quan-

tités de bore connues. Lorsque la germination est complète, on ramène à vingt graines par pot. La récolte est faite le 3 juillet, alors que les plants sont en fleurs.

| Bore en milligrammes pour 400 gr. de terre | Poids moyen d'un plant frais | Augmentation | Poids moyen d'un plan sec | Augmentation |
|---|---|---|---|---|
| — | — | — | — | — |
| 0 | 0,367 | | 0,0373 | |
| 0,5 | 0,397 | 8,2 o/o | 0,0380 | 1,8 o/o |
| 1 | 0,408 | 11,1 » | 0,0390 | 4,5 » |
| 5 | 0,375 | 2,1 » | 0,0377 | 1,0 » |
| 10 | 0,223 | | 0,0228 | |

La courbe de l'action du bore est peu élevée pour les poids secs, mais elle est pourtant bien indiquée.

Pois (variété Prince Albert). — *Première expérience.* — Dans six pots, contenant 1.200 grammes de terre, arrosés de doses respectives de bore de 0, 1, 5, 10, 50 et 100 milligrammes, on sème dix pois, le 11 février.

On ramène à six plants par pot le 4 mars. On remarque que, à longueur égale de tige, les plants arrachés des pots sans bore ou à 1 milligramme de bore ont une racine principale moins longue que les plants arrachés au pot à 10 milligrammes ; mais dans ce dernier, les racines principales manquent presque totalement de racines adventives, alors que celles-ci sont déjà développées sur les plants du pot témoin. Ce même phénomène avait été observé sur le blé cultivé en milieu liquide stérile. En coupe microscopique on n'observe aucune différence anatomique entre les racines des plants des différents pots, tout au moins dans un examen d'ensemble.

Le 13 mars, ces plants tombent malades : une trop forte humidité avait été maintenue dans les pots, et le mauvais temps obligeant à la culture en chambre, l'aération et la lumière leur avaient manqué. Je les ai alors récoltés : la hauteur moyenne était pour les différentes séries :

| Bore en milligrammes par pot | Hauteur moyenne d'un plant |
|---|---|
| — | — |
| 0 | 12 centimètres |
| 1 | 14,5 » |
| 5 | 15 » |
| 10 | 17,5 » |
| 50 | 9 » |
| 100 | 0,5 » |

L'existence d'une courbe de l'action du bore ressort nettement de ces chiffres.

*Deuxième expérience.* — Dans ces mêmes pots, sans nouvelle addition d'élément, je semai une nouvelle série de graines de pois le 5 avril. La culture a été faite en serre, mais une serre bien éclairée et permettant une bonne aération.

Une première photographie de la nouvelle culture est prise le 27 avril (planche IV) ; on y voit parfaitement l'influence favorisante des doses de bore jusqu'à 10 milligrammes pour les 1.200 grammes de terre.

Une seconde photographie est faite le 11 mai, alors que les plants sont en fleurs (planche V) ; l'action des petites doses y est encore plus nette que sur les plants jeunes.

La récolte est faite le 15 juin ; les plants sont encore fleuris, mais présentent déjà un certain nombre de gousses à maturité.

| Bore en milligrammes par pot | Poids moyen d'un plan sec | Augmentation |
|---|---|---|
| — | — | — |
| 0 | 0 gr. 170 | |
| 1 | 0 gr. 220 | 35,92 0/0 |
| 5 | 0 gr. 265 | 55,88 » |
| 10 | 0 gr. 205 | 20,58 » |
| 50 | 0 gr. 065 | |

100, 1 seul plant a germé et est mort à 2 cm. du sol.

L'expérience est tout à fait concluante en ce qui concerne

Planche IV.

*En haut : pois de 22 jours. | En bas : luzerne de 1 mois 1/2.*

Planche V. — Pois de 36 jours.

l'existence d'une courbe de l'action du bore ; le maximum est pour la dose de 5 milligrammes. La dose mortelle est située entre 50 et 100 milligrammes.

Vesce cyanhydrique. — Cinq pots, additionnés de 0, 1, 5, 10 et 50 milligrammes de bore pour 1.200 grammes de terre, sont ensemencés avec des vesces le 3 mars. La récolte est faite le 15 juin.

| Bore en milligrammes par pot | Poids moyen d'un plant sec |
|---|---|
| — | — |
| 0 | 0 gr. 049 |
| 1 | 0 gr. 040 |
| 5 | 0 gr. 048 |
| 10 | 0 gr. 043 |
| 50 | 0 gr. 020 |

Voilà la première série d'expériences qui ne nous montre aucune action favorisante des petites doses de bore. L'action défavorable se fait sentir comme pour le pois pour les doses au-dessus de 10 milligrammes.

Cette culture n'est pas cependant sans intérêt pour nous ; l'examen des racines de vesce nous a montré que de très belles nodosités sont encore produites sur les racines des plants poussés dans le pot additionné de 50 milligrammes de bore ; ces nodosités sont aussi belles que celles des plants du pot témoin sans bore. L'action toxique de l'acide borique ne porte donc nullement sur la bactérie symbiotique dans les légumineuses ; elle porte sur la croissance de la plante elle-même. Après ce que nous avons vu de l'action de l'acide borique sur les organismes inférieurs, on pouvait s'attendre à ce phénomène : la dose toxique pour les plantes est beaucoup plus faible que la dose toxique pour ces organismes.

Luzerne. — Une troisième légumineuse m'a donné de bons résultats. Semée sur des pots ayant reçu les mêmes doses de bore que dans la précédente expérience, la luzerne a présenté

durant toute sa culture un meilleur aspect dans les pots borés, surtout vers la dose de 5 milligrammes, que pour le pot témoin. Une photographie, prise le 31 juillet, c'est-à-dire après un mois et demi, l'ensemencement ayant été fait le 15 juin, montre nettement que le pot à 5 milligrammes de bore est plus fourni que les autres ; on a, bien entendu, ramené au même nombre de plants (planche IV). La récolte faite le 3 août donne les résultats suivants :

| Bore en milligrammes par pot | Poids de 15 plants | | | |
|---|---|---|---|---|
| | frais | Augmentation | secs | Augmentation |
| — | — | — | — | — |
| 0 | 6,98 | | 1,50 | |
| 1 | 6,75 | | 1,63 | 8,6 o/o |
| 5 | 8,22 | 17 o/o | 1,93 | 28,0 » |
| 10 | 6,80 | | 1,60 | 6,0 » |
| 50 | 6,20 | | 1,40 | |

Le poids frais correspond bien à l'aspect des pots. Le poids sec est plus significatif. La courbe obtenue est en somme très belle.

Toutes ces expériences sont en résumé très satisfaisantes, étant donné la difficulté qu'il peut y avoir d'opérer dans des conditions parfaitement comparables. Sur les onze expériences de 1909, sur sable ou en pots de terre, un seul cas est apparu en dehors du phénomène général, celui de la vesce. Pour tous les autres, l'existence de doses favorables de bore avant les doses toxiques semble ne pas pouvoir être niée.

### 2° Expériences en pleine terre

J'ai choisi pour ces expériences, dans les jardins de l'Institut Pasteur, des portions de terrain non cultivées depuis plusieurs années et sur lesquelles poussait un gazon naturel, mélange de Graminées et de Composées. Il m'a fallu certains tâtonnements pour trouver les doses favorables en pleine terre.

Dans une première expérience, j'avais à ma disposition deux

parcelles de terrain parallèles et exposées également de 2 mq. 5 chaque, séparées par un sentier de 50 centimètres de large. Je semai dans chacune 25 grammes de graines de maïs (maïs jaune hâtif d'Auxonne, Vilmorin), soit 148 grains. L'un des lots fut arrosé d'une solution contenant 28 gr. 2 d'acide borique, c'est-à-dire 5 grammes de bore, soit 2 grammes de bore par mètre carré. L'ensemencement fut fait le 19 avril. Dans les premiers temps, le lot boré paraît nettement plus faible que l'autre ; la germination s'y est faite avec un retard de plusieurs jours : la dose était trop forte. Cependant on poursuit la culture : le 12 juillet on ramène dans chaque lot à 60 plants. A ce moment, les plants du lot boré sont plus bas que ceux du lot témoin. On récolte le 19 août, à la suite d'un orage qui avait brisé la plupart des plants; de beaux épis étaient formés dans les plants des deux lots, mais ils n'étaient pas encore mûrs. On laisse deux plants non abimés dans chaque lot pour mener l'épi à maturité et on récolte les 58 autres. Le poids frais à la bascule des 58 plants de chaque lot est exactement le même : 13 kgr. 200. Les plants borés sont moins hauts que les témoins, mais leur tige est plus forte.

Après dessiccation, à l'air libre, le poids respectifs des deux lots était :

| | |
|---|---|
| Témoin sans bore . . . . | 3 kgr. 500 |
| Lot boré . . . . . | 3 kgr. 400 |

Nous n'avons dans cette culture aucune différence appréciable : la dose favorable a été dépassée et nous sommes dans une dose neutre pour le maïs. Les plants laissés à maturité ont donné des épis de poids sensiblement égal pour le témoin et pour le lot boré, 94 et 96 grammes secs. Le maïs est en réalité une plante supportant parfaitement de fortes doses de bore, car une culture de pois, faite sur un terrain contigu n'a pas donné vis-à-vis de cette même addition de bore des résultats analogues : presque tous les plants de pois du lot boré sont morts au bout de peu de temps, quelques-uns ont poussé jusqu'à la graine, mais restèrent jaunes et grêles.

Nous voyons déjà qu'il existe des différences dans la façon dont les espèces résistent à l'action toxique du bore. Pour celles qui, sans inconvénient, n'en supportent pas de fortes quantités, la dose favorable doit être plus faible que pour les autres.

D'autres lots de terrain ont été ensemencés avec des doses de bore plus faibles. J'ai expérimenté sur le pois, le maïs, l'avoine, le colza, puis sur le navet.

Des bandes de terre parallèles, de 1 mètre de large sur 3 mètres de long sont séparées de sentiers de 25 centimètres de large. Chaque bande de terrain est arrosée ou non de solutions boriquées. Pour chaque plante étudiée on fait trois bandes de terrain ; l'une (I) ne reçoit rien, la seconde (II) reçoit 9 grammes d'acide borique, soit 0 gr. 5 de bore par mètre carré, la troisième (III) 18 grammes d'acide borique, soit 1 gramme de bore par mètre carré.

Pois (Variété Prince Albert). — Semés le 24 juin à raison de 12 grammes de graines sèches au mètre carré. Les lots I et II paraissent les plus beaux durant toute la culture. La dose III a l'air d'être encore trop forte, bien que moitié moindre de la dose employée lors de la première expérience sur le sol.

La récolte faite le 18 août donne les résultats suivants :

| | Poids frais de la récolte | |
|---|---|---|
| | totale | des fruits |
| | — | — |
| I. 0 bore . . . . . | 474 gr. | 245 gr. |
| II. 0 gr. 5 bore au mq. | 468 gr. | 248 gr. |
| III. 1 gr. » . | 230 gr. | 93 gr. |
| | Poids sec de la récolte | |
| | totale | des fruits |
| | — | — |
| I . . . . . | 84 gr. | 38 gr. |
| II. . . . . | 85 gr. | 40 gr. |
| III . . . . . | 42 gr. | 18 gr. |

Nous voyons nettement que la dose III est toxique. La dose II

semble être à peu près indifférente ; elle paraît se rapprocher par rapport aux pois de la dose employée dans la première expérience par rapport au maïs. Il faudrait encore sans doute abaisser la dose pour trouver l'action favorisante ; la saison trop avancée ne m'a pas permis de refaire des cultures de pois.

Avoine (Avoine noire de Hongrie). — Semée le 25 juin 1909 à raison de 10 grammes de graines sèches au mètre carré.

Le 1er juillet le lot I présente de petites pointes vertes sorties du sol ; pour les lots II et III ce sont des pointes roses que l'on aperçoit. La formation de la chlorophylle paraît déjà entravée pour les doses employées.

La récolte faite en fourrage le 18 août donne les chiffres :

| | Récolte totale | |
|---|---|---|
| | poids frais | poids sec |
| | — | — |
| I. . . . . | 2 kgr. 379 | 618 gr. |
| II . . . . . | 2 kgr. 552 | 625 gr. |
| III . . . . . | 2 kgr. 185 | 520 gr. |

Pour la dose II, l'augmentation en poids frais est de 7 o/o, et de 1 o/o seulement en poids sec.

La dose II est indifférente. la dose III est déjà toxique.

L'observation est la même que celle faite précédemment sur le pois dans les mêmes conditions.

Maïs. — Semé le 25 juin à raison de 10 grammes de graines par mètre carré. On ramène dans chaque lot après germination à 24 plants. Durant toute la culture, les lots II et III se montrent plus beaux que le témoin.

La récolte est faite en fourrages le 18 août.

| | Poids frais | Augmentation | Poids sec | Augmentation |
|---|---|---|---|---|
| | — | — | — | — |
| I . . | 3 kgr. 835 | | 445 gr. | |
| II . . | 5 kgr. 985 | 56 o/o | 670 gr. | 50 o/o |
| III . | 6 kgr. 190 | 61 » | 620 gr. | 39 » |

Nous avons affaire dans ce cas à une plante supportant très bien, comme nous l'avons vu, de fortes doses de bore, et les quantités ajoutées au sol dans cette expérience sont nettement favorables. L'influence est visible à l'œil : la planche VI donne l'aspect des récoltes séchées et mises en bottes. Les plants III sont les plus hauts ; ils étaient aussi les plus lourds frais, mais en poids sec ils sont moins beaux que les plants II. Il semble que nous sommes avec eux déjà près de l'influence défavorable.

J'ai fait pour ces trois séries de maïs l'analyse de la teneur en bore des cendres : voici les résultats obtenus :

| | Acide borique o/o | |
|---|---|---|
| | de cendres | de mat. sèche |
| I. — Proportion de cendres o/o de matière sèche = 13,6 . . . . | 0,140 | 0,0190 |
| II. — Proportion de cendres o/o de matière sèche = 13,0 . . . | 0,140 | 0,0182 |
| III. — Proportion de cendres o/o de matière sèche = 15,7 . . . | 0,154 | 0,0241 |

On voit que pour la dose qui donne les meilleurs poids secs la teneur en bore est égale à celle du témoin ; la présence du bore ajouté permet un plus rapide développement de la plante qui n'a pas à chercher loin l'élément favorable et en trouve en quantité suffisante. Cette quantité est celle que la plante réussit à amasser en terre naturelle. Pour la dose III, la teneur du sol en bore fait que la plante s'en charge outre mesure : c'est le commencement de l'action toxique ; la proportion de cendres o/o de plante sèche est augmentée, et par suite la teneur en eau ; les résultats des dosages concordent parfaitement avec les résultats donnés par les poids de la récolte ; il ressort en effet de ces poids les teneurs en eau et en matière sèche suivantes :

| | Eau o/o | Mat. sèche o/o |
|---|---|---|
| I. . . . | 88,2 | 11,8 |
| II . . . | 88,9 | 11,1 |
| III . . . | 89,98 | 10,02 |

Planche VI. — Récolte de maïs en pleine terre.

*Culture de 54 jours ; 24 plants par botte.*

On voit combien sont faibles les doses actives même pour une plante comme le maïs, supportant facilement le bore.

Colza. — Semés le 28 juin, à raison de 1 gr. 5 de graines au mètre carré. Au début de la culture, les plants II et III semblent inférieurs à I, puis ils paraissent devenir plus beaux. La récolte est faite le 28 septembre. Elle donne les résultats suivants (la moyenne porte sur environ 200 plants) :

| | Poids moyen d'un plant | | | |
|---|---|---|---|---|
| | frais | augmentation | sec | Augmentation |
| | — | — | — | — |
| I. . . . | 50 gr. | | 5,75 | |
| II . . . | 62 gr. | 24 o/o | 6,97 | 21 o/o |
| III . . . | 69 gr. | 38 » | 7,28 | 26 » |

Ce sont là encore de très beaux résultats.

L'observation faite sur les maïs, en ce qui concerne la teneur en eau, est à répéter. Ces poids donnent les teneurs en eau et les matières sèches suivantes :

| | Eau o/o | Mat. sèche o/o |
|---|---|---|
| | — | — |
| I. . . . | 88,50 | 11,50 |
| II . . . | 88,75 | 11,25 |
| III . . . | 89,46 | 10,54 |

Le bore semble agir d'une façon particulière à partir d'une certaine dose sur la teneur en sels et par suite la teneur en eau de la plante.

Navets. — Sur les trois planches de pois, on sème des navets à raison de 1 gr. 8 de graines sèches par lot (0 gr. 6 au mq.), le 26 août 1909.

La récolte est faite le 13 novembre (moyenne portant sur plus de 100 plants) :

| | Poids moyen d'un plant frais | | | |
|---|---|---|---|---|
| | total | racines | tiges et feuilles | Aug. totale |
| | — | — | — | — |
| I. . . . | 22 gr. 8 | 4 gr. 8 | 18 gr. 0 | |
| II . . . | 31 gr. 5 | 7 gr. 3 | 24 gr. 2 | 38 0/0 |
| III . . . | 27 gr. 2 | 4 gr. 7 | 22 gr. 5 | 19 » |
| | Poids moyen d'un plant sec | | | |
| I. . . . | 2 gr. 15 | 0 gr. 46 | 1 gr. 69 | |
| II . . . | 2 gr. 85 | 0 gr. 65 | 2 gr. 20 | 32 0/0 |
| III . . . | 2 gr. 28 | 0 gr. 44 | 1 gr. 84 | 6 » |

Le navet est encore une plante qui semble influencée favorablement par l'addition de bore au sol. La dose II est seule favorable au développement des racines. La dose III favorise seulement la partie aérienne.

L'observation faite sur le maïs et le colza en ce qui concerne la teneur en eau est à faire de nouveau.

### Epuisement du sol en bore

Nous avons vu, dans les cultures sur sable, que les pots contenant une dose toxique ou mortelle de bore pour une première culture, en permettent une seconde meilleure. La plante absorbe du bore et diminue la teneur du sol en cet élément. La même expérience a été renouvelée en pleine terre.

Les deux lots de terrain où avaient été semés les deux premiers essais de pois en pleine terre (p. 107) et où une dose trop forte avait été employée pour le lot boré, furent ensemencés le 21 juin 1909 avec 6 grammes de graines de radis pour chacune des deux planches. Après un mois, on récolte :

| | Poids frais de 200 plants | | |
|---|---|---|---|
| | total | tiges et feuilles | racines |
| | — | — | — |
| I. 0 bore. . . | 387 gr. | 187 gr. | 200 gr. |
| II. Bore . . . | 342 gr. | 186 gr. | 156 gr. |

| | Poids sec | | |
|---|---|---|---|
| I. o bore . . . | 26 gr. 1 | 16 gr. | 10 gr. 1 |
| II. Bore . . . | 23 gr. 5 | 15 gr. | 8 gr. 5 |

On voit que la dose de bore resté est encore trop forte ; l'action défavorable porte surtout sur les racines, comme nous l'avons déjà remarqué.

Sur ce même terrain on sème à nouveau du radis le 24 juillet.

Récolte le 25 août :

| | Poids frais de la récolte | | | |
|---|---|---|---|---|
| | total | feuilles | racines | Aug. totale |
| | — | — | — | — |
| I. . . . | 1 kgr. 982 | 1 kgr. 270 | 712 gr. | |
| II . . . | 2 kgr. 127 | 1 kgr. 440 | 687 gr. | 7 o/o |
| | Poids sec | | | |
| I. . . . | 109 gr. | 75 gr. | 34 gr. | |
| II . . . | 113 gr. | 78 gr. | 35 gr. | 4 o/o |

Cette seconde récolte de radis nous montre plutôt une légère augmentation des récoltes dans le lot boré ; en tout cas il n'y a plus d'action défavorable.

Le 28 août on sème sur ce même terrain du Navet (1 gr. 8 dans chaque planche de 2 mq. 5). La récolte faite le 13 novembre donne les chiffres suivants :

| | Poids frais de la récolte totale | Nombre de plants | Poids moyen d'un plant |
|---|---|---|---|
| | — | — | — |
| I. o bore . . . | 2 kgr. 445 | 240 | 10 gr. 2 |
| II. Bore. . . . | 2 kgr. 935 | 239 | 12 gr. 3 |

On observe ici une augmentation notable : 20 o/o du poids de la récolte pour la planche borée, c'est-à-dire une augmentation analogue à celle de la planche III de l'expérience faite déjà sur le navet (p. 111). Le sol s'est appauvri en bore par les cultures successives et nous sommes passés d'une teneur mor-

telle à une teneur toxique, puis à une teneur indifférente et enfin nous avons eu la dose favorisante. C'est là un complément intéressant des expériences précédentes.

### § IV. — Conclusions de la deuxième partie

Quels sont en quelques mots les résultats acquis au cours de cette seconde partie de mon travail?

Nous n'avons pu constater aucune action favorisante des petites doses de bore sur les levures, l'*Aspergillus niger* et le ferment bulgare, aucune action favorisante sur la germination ; mais en revanche nous avons constaté sur des végétaux supérieurs dans des expériences purement synthétiques l'existence d'une action très nette de la présence de bore dans le milieu de culture : cette action peut être représentée par une courbe, d'abord ascendante sous l'influence des petites doses jusqu'à une dose optima puis descendante sous l'influence des doses toxiques jusqu'à la dose mortelle pour laquelle toute culture est impossible. Dans une série d'expériences culturales en terre arable, nous avons retrouvé la même action favorisante qui se manifeste par l'augmentation des récoltes dans les sols auxquels on a ajouté les quantités de bore optima.

Les plantes ne réagissent pas toutes de la même façon et pour le même optimum. Dans nos expériences en sol libre, le maïs, le navet, le colza nous ont donné des résultats tout à fait nets. Pour l'avoine et le pois nous n'avons pas pu avoir la dose optima : la plus faible des doses employées est encore trop forte, c'est une dose indifférente pour laquelle l'action toxique contrebalance l'action favorisante.

On a vu avec le maïs que, pour la dose optima qui donne la plus belle récolte en poids sec, la quantité de bore absorbé n'est pas plus grande pour un même poids de plante que celle absorbée par les plants poussés dans un sol non additionné

de bore. Le fait est analogue à celui déjà observé par G. Bertrand (1) sur les cultures en sol additionné de manganèse.

Lorsque la plante absorbe une quantité de bore plus forte que la quantité normale, on a dépassé la dose vraiment favorable, le poids frais augmente un peu à cause d'une surminéralisation de la plante qui entraîne une forte teneur en eau, mais le poids sec diminue.

Pour les doses toxiques, le premier symptôme qui apparaît est la disparition plus ou moins accentuée de la chlorophylle ; les jeunes plants de céréales sont pigmentés de rouge à l'extrémité des premières feuilles. Les racines sont touchées avant les parties aériennes (radis, navet).

Les augmentations de récolte produites par l'addition de bore aux liquides ou milieux solides de culture ne sont pas en rapport avec les quantités très faibles d'élément ajouté. Le bore n'agit pas chez la plante comme élément de construction passif, comme élément plastique : il agit manifestement comme élément catalytique.

Essayons maintenant de voir quel peut être ce rôle catalytique. Une étude de l'influence de l'acide borique sur les actions diastasiques nous fournira peut-être des renseignements intéressants à ce sujet.

1. *C. R. Ac. des Sc.*, t. CXLI, p. 1255, 1905.

# TROISIÈME PARTIE

## ESSAI DE DÉTERMINATION DU ROLE CATALYTIQUE DU BORE

---

## CHAPITRE UNIQUE

### INFLUENCE DE L'ACIDE BORIQUE SUR LES ACTIONS DIASTASIQUES

L'étude de l'influence des acides sur les actions diastasiques a déjà fait l'objet de nombreuses recherches. Nous ne trouvons cependant que très peu de renseignements sur l'action de l'acide borique : la faiblesse de sa fonction acide l'a rendu sans doute peu intéressant pour les auteurs et ils l'ont volontairement écarté de leurs travaux. Des études récentes, tendant à limiter le maximum d'activité à la réaction neutre au méthylorange pour l'amylase (Maquenne et Roux (1) Fernbach et Wolf) (2) et pour la laccase (G. Bertrand) (3), donnent au contraire un intérêt à l'étude de l'action sur les diastases des corps d'acidité analogue à celle des phosphates alcalins mono-

1. Maquenne et Roux. *Annales de Physique et de Chimie.* 8e série, t. IX, p. 199.

2. A. Fernbach et J. Wolf. Etude sur la saccharification des empois de fécule. *Comptes rendus Ac. des Sc.*, t. CXLV, p. 261.

3. G. Bertrand. Recherches sur l'influence paralysante exercée par certains acides sur la laccase *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXI, p. 657.

basiques : c'est le cas de l'acide borique. Il répond à la double règle établie par G. Bertrand pour les corps inactifs sur la laccase : la saturation de son premier hydrogène par la soude dégage seulement 11,6 calories, et il est neutre à l'hélianthine. Il est légèrement acide au tournesol, et acide à la phtaléine; avec l'alizarine sulfoconjuguée il donne une teinte jaune bis. Ce dernier réactif coloré n'est pas sans manquer d'intérêt pour l'étude des réactions des divers milieux. Bien que n'offrant dans une titration que le virage du jaune au rose, correspondant au virage de l'hélianthine, l'alizarine sulfoconjuguée en solution aqueuse est susceptible d'une série de quatre colorations (1) bien différentes les unes des autres :

1° Jaune franc, un peu verdâtre, avec les acides forts, le citrate monosodique, l'oxalate monosodique, l'acide carbonique ;

2° Jaune bis, avec l'acide borique, les citrates bialcalins, les phosphates monoalcalins ;

3° Rose, avec le citrate trisodique, les phosphates bialcalins, les bicarbonates alcalins, les oxalates neutres ;

4° Violet rose, avec les carbonates alcalins, les silicates alcalins et les alcalis libres.

L'addition de mannite et de glycérine à l'acide borique le fait passer du groupe 2 au groupe 1.

Ainsi, à lui seul, ce réactif permet de classer les diverses

1. Cette série de coloration est due à la formation des différents sels de l'acide alizarine sulfonique. Ils sont au nombre de trois :

1° Les sels de formule $C^{14}H^5O^2(OH)^2SO^3M$ qui sont orangés ou jaunes ;

2° Les sels $C^{14}H^5O^2 \left\{ \begin{array}{l} SO^3M \\ OM \\ OH \end{array} \right.$

qui sont violet-rouge pour les métaux alcalins, rouges pour les alcalino-terreux.

3° Les sels $C^{14}H^5O^2 \left\{ \begin{array}{l} SO^3M \\ OM \\ OM \end{array} \right.$

qui sont violets.

(C. Graebe. *Ueber Alizarinsulfonsaüre. — Berichte Deutsch. Chem. Gesell.*, t. XII, p. 571, 1879).

réactions des milieux en quatre groupes qui correspondent assez bien (sauf pour quelques cas comme $CO^2$, par exemple) aux colorations du méthylorange, d'une part, à celles de la phtaléine, d'autre part. Nous aurons occasion dans le cours de ce travail de voir l'usage qu'on peut tirer de l'emploi de ce réactif dans les études diastasiques.

A peu près tout ce qui est connu à l'heure actuelle de l'action de l'acide borique sur les diastases a trait à son inactivité. Petit (1) note son inactivité sur la pepsine ; Duclaux (2) le prétend sans action sur la sucrase, contredisant en cela un travail de Wernitz (3) où il est affirmé que l'acide borique, dès la concentration de 1/3.250e rend la sucrase inactive. G. Bertrand (4) constate la neutralité de son action sur la laccase, puis sur les peroxydiastases (5).

La seule action empêchante signalée est l'action sur la présure ; Duclaux, dans son *Traité de Microbiologie* (6) prête à l'acide borique une action analogue à celle du borax : « Il augmente la transparence du lait et retarde aussi l'action de la présure. La coagulation devient cinq fois plus lente avec 1 p. 2.000 d'acide borique et vingt fois plus lente avec 1 p. 1.000 » et Duclaux donne ainsi une explication de son emploi industriel pour la conservation du lait : « L'acide borique paralyse l'action des présures produites par les ferments de la caséine ». En 1908, Gerber (7) obtient des résultats qui contredisent formellement les données de Duclaux ; il constate une accélération très nette de la coagulation du lait emprésuré par l'addition d'acide borique.

En résumé, l'action de l'acide borique a été étudiée sur

1. Petit. *Recherches sur la pepsine*. Thèse, Paris, 1880.
2. *Traité de Chimie Biologique*, p. 181.
3. Wernitz. *Dissert. Inaug.* Dorpat, 1880.
4. *Loc. cit.*
5. G. Bertrand et Mlle Rozenband. Action de quelques acides sur les peroxydiastases. *Bull. Soc. Chim.*, 4e série, t. V, p. 296, 1909.
6. *Microbiologie*, t. II, p. 377.
7. Gerber. Action accélératrice de certains paralysants classiques des présures. II. Acide borique. — *C.R. Soc. de Biologie*, t. LXIV, p. 1178, 1908.

cinq phénomènes diastasiques seulement, et, pour deux des cas, les auteurs se trouvent en contradiction. J'ai entrepris l'étude systématique de cette action sur un certain nombre de diastases ; j'exposerai les résultats obtenus en suivant la classification parfois un peu arbitraire des diastases en :

Diastases hydrolysantes ;
Diastases coagulantes ;
Diastases oxydantes.

### § Ier. Diastases hydrolysantes

Sucrase. — J'ai étudié l'action de l'acide borique sur la sucrase préparée à partir des levures et celle fournie par l'*Aspergillus niger*.

1° *Sucrase de levure.* — On obtient, en broyant au mortier un poids égal de sable siliceux bien pur et de levure de boulangerie dans son double poids d'eau, une solution active de sucrase. Après filtration, la solution est limpide ; elle est légèrement acide au tournesol, mais plutôt alcaline à l'alizarine sulfoconjuguée avec laquelle elle donne une coloration rosée.

5 cc. d'une solution de saccharose à 20 o/o étaient additionnés de 1 cc. de solution diastasique et on complétait à 10 cc. avec de l'eau distillée pure ou contenant en dissolution les doses déterminées d'acide borique. Des témoins avec diastase bouillie étaient faits pour chaque dose. C'est là une précaution que j'ai d'ailleurs toujours prise pour toutes les expériences qui font l'objet de cette partie du travail. Le tout était porté dans un bain-marie réglé à température constante. Au bout du temps désiré, on arrêtait l'action diastasique par addition d'un excès de soude et le sucre réducteur formé était dosé par la méthode indiquée par G. Bertrand.

Le tableau suivant donne les résultats obtenus dans une

première série d'expériences faites avec des doses relativement élevées, variant de 3 à 6 grammes par litre :

| Acide borique en millionièmes | Sucre réducteur formé o/o cc. de liquide | | |
|---|---|---|---|
| | 1 h. à 17° | 1 h. à 55° | 3 h. à 52° |
| 0 | 3 gr. 25 | 5 gr. 63 | 6 gr. 21 |
| 3.000 | 3 gr. 31 | 5 gr. 65 | 6 gr. 28 |
| 6.000 | 3 gr. 45 | 5 gr. 75 | 6 gr. 07 |
| 9.000 | 3 gr. 36 | 5 gr. 65 | 5 gr. 89 |
| 12.000 | | 5 gr. 47 | 5 gr. 55 |

L'action empêchante de l'acide borique sur la sucrase annoncée par Wernitz n'est donc nullement retrouvée. Au contraire, les doses entre 3 et 6 grammes par litre nous semblent avoir une très légère influence favorisante, plus accentuée si l'on se trouve éloigné de la température optima. Nous sommes amenés à nous demander si l'action de l'acide borique sur la sucrase ne présenterait pas une courbe à maximum analogue à celles obtenues pour l'action des acides forts par Fernbach (1). Le maximum aurait déjà été dépassé dans les expériences du tableau précédent. Voici les résultats expérimentaux obtenus pour des doses d'acide borique de grandeur très variée :

| Acide borique en mmgr. par litre | Sucre réducteur o/o cc. liq. 2 h. à 52° |
|---|---|
| 0 | 3 gr. 88 |
| 25 | 3 gr. 92 |
| 50 | 4 gr. 05 |
| 100 | 3 gr. 92 |
| 200 | 4 gr. |
| 500 | 4 gr. 19 |
| 1.000 | 4 gr. 19 |
| 2.000 | 4 gr. 10 |
| 6.000 | 4 gr. 08 |
| 12.000 | 3 gr. 86 |
| 30.000 | 3 gr. 57 |

1. A. Fernbach. *Recherches sur la sucrase*. Thèse, Paris, 1890.

Bien que peu élevée, la courbe est très nette. L'action favorisante se manifeste jusqu'à des doses de 6 grammes par litre ; un optimum est visible et soutenu vers des doses de 0 gr. 5 à 1 gr. par litre. L'influence nettement défavorable ne commence guère qu'au delà de 12 gr. par litre ; en présence de 30 gr. par litre la sucrase se comporte encore très bien, puisque la quantité de sucre réducteur formée est, avec celle formée dans le témoin sans acide borique, dans le rapport de 9/10.

2° *Sucrase d'Aspergillus.* — Avec la sucrase de l'*Aspergillus niger*, préparée d'après la méthode indiquée par Fernbach, l'existence d'une courbe de l'action de l'acide borique est encore plus nette. La solution de sucrase est neutre au tournesol ; elle est très peu active si on ne l'additionne d'aucune trace d'acide. J'ai suivi la même technique que pour les expériences précédemment décrites sur la sucrase de levure. Malgré sa faible acidité, l'acide borique est susceptible de renforcer l'activité de la sucrase d'*Aspergillus*, jusqu'à 1/3 en plus de son activité primitive pour la dose optima qui est pour des concentrations bien plus élevées que dans le cas de la sucrase de levure (12 gr. par litre). Cela ressort nettement des chiffres suivants :

| Acide borique en millionièmes | Sucre réducteur o/o cc. de liq. | |
|---|---|---|
| | 1 h. à 50° | 2 h. à 52° |
| — | — | — |
| 0 | 0 gr. 235 | 0 gr. 508 |
| 25 | 0 gr. 285 | 0 gr. 540 |
| 50 | 0 gr. 301 | |
| 100 | 0 gr. 282 | 0 gr. 523 |
| 200 | 0 gr. 285 | 0 gr. 572 |
| 500 | 0 gr. 248 | 0 gr. 617 |
| 1.000 | 0 gr. 246 | 0 gr. 661 |
| 2.000 | 0 gr. 324 | 0 gr. 630 |
| 6.000 | 0 gr. 382 | 0 gr. 770 |
| 12.000 | 0 gr. 385 | 0 gr. 775 |
| 30.000 | 0 gr. 363 | 0 gr. 770 |

Il est curieux de voir combien nous sommes loin d'une action empêchante, puisque en présence de 30 gr. par litre nous voyons la diastase agir plus activement qu'en l'absence d'acide borique.

En résumé, on peut dire que, pour la sucrase d'*Aspergillus* ou de levure, l'acide borique n'est à aucune dose un empêchant. Sa dose optima est très élevée : 12 gr. par litre. Dans le cas de la levure, cet optimum est abaissé et la courbe est peu accentuée. Il y a sans doute dans l'extrait de levure des sels dont l'acide borique à dose élevée déplacerait l'acide : ce ne serait plus alors l'action de l'acide borique seul que nous observerions. Avec la préparation de sucrase d'*Aspergillus* qui est relativement très pure, la courbe peut s'élever plus longtemps.

Il n'y a pas lieu de tenir compte de l'action hydrolysante de l'acide borique aux températures auxquelles on expérimente : les tubes témoins à diastase bouillie et doses croissantes d'acide ne présentent entre eux que des différences inappréciables, sans rapport visible avec leurs teneurs en acide.

Amylase. — Ainsi qu'on pouvait s'y attendre après les travaux de Maquenne et Roux et de Fernbach et Wolf, l'acide borique, neutre à l'hélianthine ne présente aucune action empêchante bien nette sur les amylases végétales et animales. La liquéfaction de l'empois et la formation du maltose ne sont que très faiblement influencés par la présence, même en quantité relativement considérable, de cet acide.

1° *Amylase végétale. Liquéfaction de l'empois.* — On met dans deux becherglass 50 grammes d'empois d'amidon à 10 o/o, préalablement neutralisé. A l'un d'eux on ajoute 10 milligrammes d'acide borique. On les additionne de 4 cc. d'extrait de malt à 10 o/o. On laisse 7 minutes en contact en agitant de temps en temps ; on ajoute alors 1 cc. de soude normale pour arrêter l'action diastasique et on mesure la viscosité par le temps que met à se vider une même burette pleine de l'un ou l'autre des liquides.

J'ai obtenu les chiffres suivants dans deux expériences successives. La burette employée se vidait d'eau distillée en 25″ :

| | 0 ac. bor. | 10 mgr. ac. bor |
|---|---|---|
| Première expérience. . . | 50″ | 50″ |
| Deuxième expérience . . | 52″ | 51″ |

De l'amidon fait avec de l'eau boriquée (3 o/o) est d'ailleurs rapidement liquéfié par l'extrait de malt. L'extrait de malt fait avec de l'eau boriquée possède toute son activité, et cette propriété peut être employée pour avoir des extraits qui ne fermentent pas rapidement.

Une faible quantité de borax entrave au contraire l'action de la diastase ; son alcalinité en est la cause, ainsi que celle de toutes les influences empêchantes du borax observées par J.-B. Dumas (1) sur différents ferments solubles.

*Formation de sucre réducteur.* — Dans deux vases on met 100 grammes d'empois d'amidon à 10 o/o auquel on ajoute :

A. 50 cc. d'eau distillée ;

B. 50 cc. d'eau boriquée (3 o/o);

Puis 50 cc. d'un extrait de malt à 10 o/o.

La liquéfaction est instantanée. On place les deux vases dans une étuve à 35° et on suit la formation du sucre en comptant le nombre de gouttes des deux liquides qui décolorent 5 cc. de réactif de Fehling après des temps donnés :

| Après | A | B |
|---|---|---|
| 0 h. 3/4 | 40 gouttes | 40 gouttes |
| 1 h. 1/2 | 30 — | 30 — |
| 4 h. | 23 — | 23 — |
| 6 h. | 23 — | 22 — |

Ainsi nous ne voyons aucune différence dans la vitesse de formation du maltose par l'extrait de malt en l'absence d'acide

1. J. B. Dumas. *Comptes rendus de l'Ac. des Sciences*, t. LXXV, p. 181, 1872.

borique ou en présence de cet acide à la concentration pourtant élevée de 1 o/o.

De nombreux essais faits avec des extraits de blé germé et non germé m'ont donné des résultats identiques.

2° *Amylase animale.* — J'ai employé pour ces essais la pancréatine de Merck en solution filtrée 1 o/o. 10 cc. d'un empois d'amidon à 5 o/o sont additionnés de quantités variées d'acide borique et de 1 cc. de solution de pancréatine. L'attaque est faite au bain-marie réglé à 40°. Après le temps d'action désiré, on dose le sucre par la méthode de G. Bertrand. Voici les résultats de deux expériences, faites dans ces conditions :

| Acide borique en millionièmes | Sucre réducteur formé | |
|---|---|---|
| 0 | 63 mgr. 6 | 106 mgr. 5 |
| 50 | | 105 mgr. 5 |
| 500 | 66 mgr. 3 | 108 mgr. 1 |
| 7.500 | 62 mgr. 1 | 100 mgr. 5 |
| 13.500 | 56 mgr. 6 | 88 mgr. 0 |

13.500 (diastase bouillie) aucune réduction.

Les deux expériences, bien que non comparables entre elles pour les valeurs absolues de sucre dosé (ce dernier n'a pas été titré sur une même quantité de liquide), le sont très nettement quant à la marche du phénomène. Celle-ci peut être exprimée par une courbe légèrement ascendante jusqu'à des doses de 500 millionièmes ; puis pour les doses supérieures, une légère diminution du sucre produit apparaît. Si nous étudions quelle est la réaction des milieux des divers essais vis-à-vis des indicateurs colorés, nous voyons que, quelle que soit la dose d'acide borique, ils sont neutres à l'hélianthine et qu'ils virent légèrement le papier de tournesol à la teinte acide. L'alizarine sulfoconjuguée nous montre au contraire des différences entre eux. Jusqu'à la dose de 500 millionièmes, la coloration par l'alizarine est rose très nettement ; pour les doses supérieures elle est jaune bis. Il est à remarquer

que le point maximum de notre courbe paraît antérieur au virage de l'alizarine au jaune Pour les teintes jaunes l'acide borique est devenu défavorable. L'alizarine nous permet ainsi de fixer de façon plus précise la réaction optima du milieu ; celle-ci correspondrait pour l'amylase animale à la teinte neutre, située entre le rose et le jaune bis, puisque, de part et d'autre, il y a décroissance de la quantité de sucre formé, soit une teinte rose très léger.

Nous allons voir qu'il en est de même pour l'émulsine.

Emulsine. — Je me suis servi dans les expériences qui suivent d'émulsine Merck en solution 1 o/o filtrée. Je fais agir cette solution sur de l'amygdaline en solution 4 o/o, à température ordinaire.

5 cc. de la solution d'amygdaline + 2 cc. sol. d'émulsine + 5 cc. d'eau contenant en dissolution les quantités voulues d'acide borique. Le sucre est dosé sur la totalité des liquides, l'action diastasique ayant été arrêtée en même temps dans tous les tubes par un chauffage de 5′ à l'ébullition.

| Ac. borique en sol. | Sucre réducteur dosé, après | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 20′ | 1/4 h. | 1/2 h. | 1 h. |
| 0 | 43 mgr. 7 | 23 mgr. 4 | 36 mgr. 8 | 61 mgr. 2 |
| N/500 | 44 mgr. 2 | 23 mgr. 7 | 37 mgr. 5 | 58 mgr. 5 |
| N/100 | 42 mgr. 2 | | | |
| N/50 | 41 mgr. 5 | | | |
| N/25 | | 21 mgr. 8 | 36 mgr. 7 | 57 mgr. 2 |
| N/12 | 39 mgr. 7 | | | |
| N/8 | 37 mgr. 8 | | | |
| N/5 | 34 mgr. 8 | 19 mgr. 7 | 32 mgr. 9 | 49 mgr. 0 |

Il ressort de ce tableau d'expériences que l'acide borique présente une influence défavorable qui devient nette si l'on dépasse les doses N/50. Deux questions se posent : y a-t-il une dose favorable au-dessous des doses étudiées et l'action défavorable est-elle simultanée sur la double action diasta-

sique de l'émulsine : formation de l'amydonitril-glucoside et décomposition de ce dernier en glucose, acide cyanhidrique et benzaldéhyde. L'expérience suivante va nous renseigner à ce sujet.

25 cc. de solution d'amygdaline à 4 o/o + 5 cc. de solution d'émulsine à 1 o/o + 20 cc. d'eau contenant en dissolution des doses croissantes d'acide borique sont mis en contact à la température ordinaire en matras scellés pour éviter les pertes d'HCN ; après une heure et demie d'action, on arrête l'hydrolyse diastasique en portant les matras scellés au bain-marie bouillant. Le sucre est titré par la méthode Bertrand sur 5 cc. de liquide et l'acide cyanhydrique est dosé sur les 45 cc. restant par la méthode cyanoargentimétrique de Denigès (1) après entraînement à la vapeur d'eau.

| Acide borique en solution | | HCN pour 50 cc. | Sucre pour 50 cc. |
|---|---|---|---|
| 0 | soit 0 | 30 mgr. 3 | 394 mgr. 2 |
| N/2.500 | 25 | 30 mgr. 9 | 402 mgr. 5 |
| N/625 | 100 | 31 mgr. 8 | 419 mgr. 0 |
| N/62 | 1.000 | 31 mgr. 2 | 394 mgr. 2 |
| N/5 | 12.000 | 28 mgr. 8 | 351 mgr. 1 |
| N/2 | 30.000 Millionièmes | 20 mgr. 7 | 260 mgr. 7 |

Cette expérience répond aux deux questions que nous nous étions posées : une action favorable est exercée par l'acide borique sur l'émulsine jusqu'à des doses de l'ordre du décigramme par litre ; puis pour des doses plus élevées l'action défavorable apparaît nettement, et à la fois pour les deux phénomènes d'hydrolyse diastasique : la production de glucose et celle d'acide cyanhydrique restent parallèles pour les différentes doses d'acide borique.

L'action de ce dernier sur l'émulsine peut donc être représentée par une courbe dont le point maximum correspondrait

1. Denigès. *Annales de Chimie et de Physique*, t. VI, 7e série, 1895.

à la dose de 100 millionièmes, soit N/625. La descente de la courbe correspond à un changement de teinte des milieux à l'alizarine; avant le point maximum la coloration est rose, après ce point elle est jaune bis rosé, puis jaune bis. Ici encore, comme pour l'amylase pancréatique nous pouvons établir un optimum plus précis que la neutralité à l'hélianthine, qui est celle à l'alizarine.

L'action empêchante de l'acide borique sur l'émulsine aux doses élevées n'est cependant pas très considérable si on la compare à celle des acides forts, puisque le ferment peut encore agir en présence d'une solution saturée de cet acide. Voici par exemple une expérience faite avec l'acide chlorhydrique dans les conditions des premières expériences exposées ici pour l'acide borique :

| | HCl en solution | Sucre titré |
|---|---|---|
| | — | — |
| témoin | 0 | 43 mgr. 0 |
| | N/5.000 | 3 mgr. 6 |
| | N/250 | 1 mgr. 7 |
| | N/50 | 4 mgr. 1 |

L'action diastasique est pour ainsi dire arrêtée aux doses les plus faibles. Le phosphate monosodique agit à peu près avec la force de l'acide borique :

| | Phosphate monosodique en solution | Sucre titré |
|---|---|---|
| | — | — |
| témoin | 0 | 41 mgr. 3 |
| | N/500 | 41 mgr. 3 |
| | N/25 | 38 mgr. 1 |
| | N/5 | 39 mgr. 3 |

Lipodiastase du ricin. — La saponification de l'huile de ricin par la pulpe broyée des graines de cette plante est très fortement paralysée par la présence d'acide borique, et ce fait est d'autant plus curieux que cette action diastasique est par-

ticulièrement activée par une acidification du milieu assez élevée (1). L'acide borique est pour elle un empêchant énergique, même en présence des doses *optimæ* d'acide fort.

2 gr. 5 de pulpe de graines de ricin broyée au mortier sont mélangés avec 4 cc. d'huile de ricin, en présence de doses d'acide borique variées, avec ou en l'absence de la dose optima d'acide sulfurique.

Après une heure de contact à température ordinaire, on ajoute à chaque essai 20 cc. d'alcool à 95°; on ramène tous ceux-ci à la même acidité sulfurique et borique, et on titre l'acidité avec de la soude normale, en présence de phtaléine.

*Première expérience*

| | Soude N employée |
|---|---|
| 2 cc. eau. . . . . | 1 cc. 15 |
| 2 cc. ac. sulf. N/10 . . . . . | 7 cc. 90 |
| 2 cc. eau + 60 mgr. ac. bor. . . . . | 0 cc. 85 |
| 2 cc. ac. sulf. N/10 + 60 mgr. ac. bor. | 3 cc. 20 |

*Deuxième expérience*

| | |
|---|---|
| 2 cc. eau. . . . . | 1 cc. 55 |
| 2 cc. ac. sulf. N/10 . . . . . | 5 cc. 10 |
| 2 cc. eau + 30 mgr. ac. bor. . . . . | 1 cc. 45 |
| 2 cc. ac. sulf. N/10 + 30 mgr. ac. bor. | 2 cc. 40 |
| — — + 60 mgr. ac. bor. | 2 cc. 30 |

*Troisième expérience*

| | |
|---|---|
| 2 cc. eau. . . . . | 0 cc. 70 |
| 2 cc. ac. sulf. N/10 . . . . . | 5 cc. 40 |
| 2 cc. eau + 6,2 mgr. ac. bor. . . . | 0 cc. 60 |
| 2 cc. ac. sulf. N/10 + 6,2 mgr. ac. bor. | 2 cc. 90 |

1. Connstein, Hoyer et Wartenberg. *Ber. deut. chem. Gesell.*, t. XXXV, p. 3988, 1902.

L'action empêchante de l'acide borique est nette. Dans les trois expériences, les témoins non acidifiés par la dose favorisante d'acide fort ont produit une très faible quantité d'acides de plus que les témoins à acide borique. L'influence activante de l'acide sulfurique semble être entravée par la présence d'acide borique. La quantité d'acides gras formée par la lipodiastase en présence de la quantité optima d'acide fort est réduite environ de moitié si l'action se fait en présence d'acide borique. Cette action nuisible se manifeste pour des quantités peu élevées, puisque dans la dernière expérience j'ai employé seulement une quantité d'acide borique moléculairement équivalente à la quantité d'acide sulfurique ajoutée, c'est-à-dire 1/10 normale pour les deux centimètres cubes d'eau que l'on émulsionne avec l'huile et la pulpe de graine.

Quel est le mécanisme de cette propriété de l'acide borique ? C'est ce qu'on ne saurait dire à l'heure actuelle. La lipodiastase est un ferment très sensible qui n'a pu jusqu'ici être séparé des cellules de la pulpe de graines de ricin et purifié. L'action de l'acide porte-t-elle sur le mécanisme diastasique lui-même, ou bien est-ce une rétraction quelconque du protoplasma qui se produit, empêchant le passage de la diastase. La question reste à résoudre. Dans le premier cas, ce serait la première influence nettement nuisible de l'acide borique que nous trouvons sur les diastases depuis le début de ce travail.

Diastases protéolytiques. — 1° *Pepsine.* — L'acide borique ne peut, à aucune dose, même celle de 40 grammes par litre, jouer pour la pepsine le rôle de complémentaire active. En présence de la dose nécessaire d'acide chlorhydrique, l'acide borique n'augmente ni ne diminue la vitesse des digestions pepsiques.

Ces deux propositions ressortent nettement des divers essais exécutés et sont en concordance avec les expériences de

Petit (1). Je me suis servi pour cette série d'expériences de l'essai du Codex de 1908 qui est basé sur la méthode de Petit : observation du temps nécessaire à la digestion d'une fibrine pour que le liquide de digestion ne précipite plus par l'acide azotique.

Une série de vases maintenus à 50° dans un bain-marie réglé à température constante, contenant chacun 0 gr. 10 de pepsine, 2 gr. 5 de fibrine desséchée, 10 cc. de HCl à 10 o/o et des doses d'acide borique variant de 0 à 40 grammes par litre, ne présentent aucune différence dans la marche de la digestion et ne donnent plus de précipité par l'acide azotique les uns comme les autres après quatre heures de contact.

La fibrine est au contraire restée intacte après 24 heures dans des vases placés à la même température, contenant les mêmes doses d'acide borique, mais sans acide chlorhydrique.

La pepsine employée pour ces essais était une pepsine commerciale dite absolue.

2° *Trypsine.* — Des essais faits par la méthode de Mett, en faisant agir sur des tubes de blanc d'œuf coagulé des solutions de pancréatine en présence de quantités variées d'acide borique n'ont montré entre eux aucune différence. J'ai cherché plus de précision dans l'emploi d'une méthode récemment indiquée par Sörensen (2); elle consiste en la titration directe des acides aminés formés par l'hydrolyse des matières protéiques. Ces acides ne réagissent pas à l'état libre comme des acides sur les indicateurs colorés, à cause de leur fonction amine. Si l'on arrive à bloquer cette fonction par un artifice quelconque, on pourra titrer l'acide aminé comme un acide ordinaire. A cet effet, Sörensen emploie le formol.

Je fais agir sur 2 grammes de fibrine séchée, mis dans 40 cc. d'eau tenant en solution l'acide borique aux doses désirées, 10 cc. d'une solution filtrée de pancréatine (pancréatine Mac-

1. *Loc. cit.*

2. Sörensen. Etudes enzymatiques. — *Comptes rendus du Laboratoire de Carslberg*, 7e volume, I, 1907.

quaire répondant à l'essai du Codex 1908, 2 grammes pour 100 cc. d'eau) à l'étuve à 40°. Au bout de temps déterminés, on prélève 10 cc. de liquide de digestion. On les met en présence d'un mélange de 5 cc. de formol et de 5 cc. d'alcool à 95° additionnés de 1 cc. d'une solution de phtaléine du phénol à 2 0/0, mélange qu'on a préalablement neutralisé.

On titre l'acidité à la soude N/10, après avoir amené les différents essais à la même concentration en acide borique, de façon à éliminer l'erreur qui provient de la difficulté de titration absolue de cet acide en présence de pthaléine. Voici les résultats d'une expérience faite dans ces conditions :

| Acide borique en millionièmes | Soude N/10 pour 10 cc. de liquide | |
|---|---|---|
| | après 3 h. | après 6 h. |
| — | — | — |
| 0 | 9 cc. 5 | 13 cc. 4 |
| 50 | 9 cc. 45 | 13 cc. 1 |
| 500 | 10 cc. 1 | 13 cc. 7 |
| 15.000 | 9 cc. 6 | 13 cc. 2 |

Aucune différence bien nette n'apparaît qui puisse indiquer l'existence d'une influence soit favorable, soit défavorable. Il paraît y avoir un optimum vers la dose de 500 millionièmes. Cette dose correspond à la teinte jaune bis rosé avec l'alizarine, teinte de la neutralité. Il est à remarquer que la dose d'acide borique optimale pour la digestion de la fibrine par la trypsine est la même que la dose optimale pour la digestion de l'amidon par la pancréative (Voir p. 125).

3° *Papaïne.* — La papaïne n'est pas non plus influencée par la présence d'acide borique. Les expériences qui suivent ont été faites dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites ci-dessus pour la pancréatine. La marche de la digestion a été suivie de même par des titrations des acides aminés formés par la méthode de Sörensen.

| Acide borique en millionièmes | Soude N/10 pour 10 cc. de liquide après 3 h. | après 6 h. |
|---|---|---|
| — | — | — |
| 1re Exp. 0 | 5 cc. 35 | 6 cc. 9 |
| 50 | 5 cc. 25 | 6 cc. 75 |
| 500 | 5 cc. 25 | 6 cc. 9 |
| 2e Exp. 0 | | 9 cc. 9 |
| 40.000 | | 9 cc. 7 |

Pas d'optimum visible et pas d'action empêchante, puisque la diastase fonctionne encore en présence de 40 grammes par litre d'acide borique (1).

### § II. — **Diastases coagulantes**

Présure — En ce qui concerne la présure, j'ai repris les expériences de Gerber. Je n'ai expérimenté qu'avec la présure animale. J'ai employé comme source de présure la présure de Hansen en pastilles, mise en solution à raison d'une pastille dans 100 cc. d'eau distillée. Le lait employé est un lait commercial pur que je centrifuge préalablement. Je dois dire tout d'abord que j'ai obtenu des résultats analogues à ceux de Gerber : l'acide borique présente sur la coagulation du lait par la présure une influence favorisante. Il est assez difficile de noter les temps de coagulation à 40°, bien que par comparaison il m'ait toujours été possible de constater que les tubes boriqués coagulaient avant les tubes témoins non boriqués. L'action favorisante de l'acide borique ne laisse pas de doute si on opère à température éloignée de la température optima. A température ordinaire, par exemple, les différences de temps de coagulation entre les tubes riches en acide borique

1. S. Yostimoto a récemment signalé une action favorisante de l'acide borique sur l'autolyse des tissus, jusqu'à la concentration optima de 1 o/o. *Zeitsch. f. physiol. Chem.*, t. LVIII, p. 341, 1909.

et les témoins peuvent dépasser deux heures; il n'y a plus alors de doute possible à l'égard de l'influence de l'acide borique.

Je donne ci-dessous en tableau quelques-uns des résultats obtenus ; le temps de coagulation est pris au moment où le tube peut être retourné.

| Doses d'acide borique en millionièmes | Temps de coagulation | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 5 cc. lait + 0,2 présure | | 10 cc. lait + 0,2 présure | 10 cc. lait + 0,04 présure (1) | | 10 cc. lait + 0,2 présure | |
| | 36° | T. ord. | 36° | 36° | 40° | T. ord. | 35° |
| 0. . . . . | 8′10″ | 3 h. | 7′ | 12′45″ | 6′30″ | 58′ | 2′45″ |
| 125. . . . . | | | 7′ | 10′45″ | 6′45″ | 58′ | 2′40″ |
| 250. . . . . | 8′10″ | 3 h. | 7′ | 10′20″ | 6′15″ | | |
| 500. . . . . | 8′10″ | 1 h. 50′ | | | | | |
| 625. . . . . | | | 7′ | 10′30″ | 6′5″ | | |
| 1.250. . . . . | 8′10″ | 1 h. 20′ | 5′15″ | 9′15″ | 6′10″ | 48′ | 2′30″ |
| 2.500. . . . . | 7′30″ | 43′ | 4′30″ | 8′20″ | 6′5″ | 17′ | 2′25″ |
| 5.000. . . . . | 5′10″ | 39′ | | | | | |
| 30.000 . . . . | . . | | | | | 3′ | |

Pour me rendre compte du mécanisme de l'action de l'acide borique sur la coagulation du lait j'ai été amené à refaire les expériences de Gerber sur les phosphates monobasiques (2) et les citrates bibasiques (3). Je suis encore tombé sur les mêmes résultats que cet auteur. Le phosphate mon potassique est un

1. 0 cc. 4 de la solution de présure diluée dix fois

2. Gerber. Action des phosphates acides de potassium et de sodium sur la coagulation du lait par les présures. *C. R. Société de Biologie*, t. LXIV, p. 141, 1908.

3. Gerber. Action des sels de potassium et de sodium à acides organiques sur la coagulation du lait par les présures, *id.* t. LXIV, p. 783, 1908.

accélérateur très puissant, bien plus puissant que l'acide borique pour la coagulation du lait par la présure : du lait emprésuré (0 cc. 2 de la solution ordinaire pour 10 cc.) additionné de monophosphate de potasse de façon qu'il s'y trouve en solution N/20 coagule en 5 minutes à température ordinaire, alors que sans cette addition il n'est pas encore coagulé après 1 h. 1/2.

Voici une expérience comparant l'action du phosphate monopotassique à celle de l'acide borique.

5 cc. de lait sont traités avec 0 cc. 2 de ma solution de présure *diluée 20 fois*. L'expérience est faite à 40°.

| | Teneur en : | phosphate monopotassique | acide borique |
|---|---|---|---|
| témoin | 0 | 26′45″ | 23′20″ |
| | N/200 | 20′30″ | 22′40″ |
| | N/100 | 16′15″ | 22′40″ |
| | N/40 | 10′45″ | 22′ |
| | N/20 | 8′25″ | 20′40″ |

On voit combien est grande l'action favorisante du phosphate par rapport à celle de l'acide borique.

Je retrouve pour le citrate bisodique le phénomène qu'indique Gerber : présence d'une action défavorable pour de faibles doses, puis apparition d'une action favorisante ; l'expérience suivante a été faite à 39° avec la présure diluée comme dans l'expérience précédente :

| | Citrate monosodique en solution | |
|---|---|---|
| témoin | 0 | coagulé en 28 minutes. |
| | N/240 | petit caillot rétracté après 2 h. 1/4. |
| | N/120 | rien après 2 h. 1/4. |
| | N/60 | |
| | N/45 | précipité grumeleux après 1/2 heure. |
| | N/30 | caillot lâche formé après 10 minutes. |
| | N/24 | |
| | N/12 | tube retournable après 4 minutes. |

Dans ces actions sur la coagulation interviennent, sans qu'aucun doute puisse être possible, autre chose que des questions d'acidité. On connaît déjà un acide agissant un peu comme l'acide borique : c'est l'acide carbonique ; du lait saturé de $CO^2$ coagule plus rapidement par la présure. Quel peut être le mode d'action de l'acide borique dans ces phénomènes ? Porte-t-il sur l'action diastasique de la présure sur la caséine ou seulement sur le phénomène de la coagulation des produits formés ?

Le lait non emprésuré ne coagule pas par addition d'acide borique à saturation ; saturé à froid d'acide borique il ne se coagule pas à 100°. Si on laisse en excès d'acide borique qui permette la saturation du lait pour la température de 100°, l'acide borique le coagule à cette température. Il en est de même pour le phosphate monopotassique. L'acide borique se présente déjà comme une substance ayant des propriétés coagulantes sur la caséine non transformée par la présure.

En réalité il semble bien n'intervenir dans les phénomènes de coagulation par la présure que comme adjuvant des sels de chaux. L'expérience suivante prouve qu'il n'agit pas sur la transformation diastasique de la caséine.

A température ordinaire 5 cc. de lait sont additionnés de 0 cc. 2 de solution de présure dans trois tubes à essai (I, II et III). A l'un d'eux (III) on a ajouté avant l'expérience de l'acide borique en quantité telle qu'il se trouve dans le lait en solution N/10. On fait agir la présure sur les trois tubes pendant 5 minutes. On ajoute alors :

Au tube I 0 cc. 5 de $CaCl^2$ à 10 0/0 ;

Au tube II 0 cc. 5 de $CaCl^2$ à 10 0/0 + même quantité d'acide borique que celle mise au début de l'expérience dans III ;

Au tube III 0 cc. 5 de $CaCl^2$ à 10 0/0.

Les tubes II et III se prennent en masse en moins de 2 minutes.

Le tube I n'est coagulé qu'en une demi-heure.

La rapidité de coagulation des tubes à la fois boriqués et calcifiés est remarquable ; elle est la même, que l'acide borique

ait été présent pendant le temps d'action de la présure ou qu'il ait été ajouté en même temps que $CaCl^2$, ce qui montre bien que l'acide borique n'a qu'un rôle de coagulant. Le mélange d'acide borique et de $CaCl^2$ est d'une extraordinaire activité. Le chlorure de calcium seul est 15 fois moins actif. L'acide borique seul est très peu actif : du lait rendu exempt de sels de chaux par addition de 1/1.000e d'oxalate de potassium ne coagule plus par la présure; un petit précipité caillebotteux apparaît cependant au bout de quelque temps sous l'influence de fortes doses d'acide borique. Quelle est la nature du coagulum formé dans ce dernier cas ? C'est une question que de nouvelles expériences me permettront sans doute d'élucider.

En résumé, l'action de l'acide borique apparaît comme celle d'un coagulant : nous allons retrouver dans l'étude de son action sur la pectase un semblable rôle d'adjuvant des sels de chaux.

Pectase. — La pectine qui a servi à mes expériences est préparée d'après la méthode qu'ont indiquée MM. G. Bertrand et Mallèvre (1) dans leur travail sur la fermentation pectique. La solution à 2 o/o est neutralisée bien exactement, précaution très importante.

La pectase a été préparée à partir du trèfle. On broie et on presse des feuilles de trèfle. Le liquide est abandonné pendant 24 heures en présence d'un peu de chloroforme. On filtre. On précipite par trois volumes d'alcool à 96°. On centrifuge le précipité obtenu et on le reprend par l'eau. La partie soluble est reprécipitée par trois volumes d'alcool, centrifugée et rapidement séchée dans le vide. Le produit obtenu est mis en solution à raison de 0 gr. 5 o/o dans nos expériences. Cette solution était additionnée de quelques gouttes de $CaCl^2$ N/10.

Dans toutes nos expériences, les concentrations en acide borique varient de N/80 à N/2. Il est très difficile de faire

1. Bertrand et Mallèvre. Recherches sur la pectase et la fermentation pectique. — *Bull. Soc. Chim.*, t. XIII, pp. 77 et 252, 1895.

une détermination exacte du temps de coagulation, mais, par comparaison, j'ai toujours pu observer que les tubes additionnés d'acide borique coagulaient avant les tubes témoins, sauf cependant pour les doses élevées, voisines de la saturation. Voici par exemple des temps expérimentaux obtenus :

1 cc. de pectine + 1/2 cc. sol. de pectase + 1/2 cc. $H^2O$ tenant l'acide borique en solution.

| Acide borique en solution | Temps de coagulation |
|---|---|
| 0 . . . . . | 1 h. 10′ |
| N/80 . . . | 40′ |
| N/40. . . . | 45′ |
| N/20. . . . | 1 h. |
| N/8 . . . . | 1 h. |
| N/2 . . . . | 1 h. 10′ |

Le temps de coagulation est pris ou moment où l'on peut retourner le tube. Il paraît y avoir un maximum pour des doses pas trop élevées, chose que nous n'avions point vue pour la coagulation du lait. Nous observons cependant encore ici une influence coagulante de l'acide borique, influence qui semble compléter celle des sels de calcium sans lesquels la pectase ne peut donner de coagulation.

Avec le phosphate monopotassique nous n'obtenons pas les mêmes résultats que dans le cas du lait et de la présure. Ici c'est une influence empêchante très nette qui nous apparaît ; le phosphate monopotassique, sans être un corps d'acidité aussi forte que HCl ou l'acide malique, dont MM. G. Bertrand et Mallèvre ont signalé l'action empêchante sur la fermentation pectique, se rapproche alors de ces acides et non de l'acide borique comme on aurait été tenté de le croire.

| | | |
|---|---|---|
| I° Témoin . . . . | | retournable après 1 h. 1/4. |
| $PO^4H^2K$ | N/40<br>N/20 | liquides aprés 4 heures. |
| Acide borique | N/8 | retournable après 1 heures. |

| | | Temps de coagulation |
|---|---|---|
| II° Témoin . . . . . | | 55′ |
| $PO^4H^2K$ | N/800. . . | 1 h. 1/2 |
| | N/400. . . | 1 h. 1/2 |
| | N/200. . . | 3 h. |
| | N/80 . . . | Non retournable après 3 h. 1/2. |

Le citrate disodique paraît encore plus empêchant et ne donne pas le phénomène observé avec la caséine d'une dose empêchante suivie d'une dose favorisante :

| | | Temps de coagulation |
|---|---|---|
| Témoin . . . . . | | 1 h. |
| Citrate disodique en solution | N/800 . . | 3 h. |
| | N/400 . . | 3 h. |
| | N/200 . . | 6 h. |
| | N/80. . . | 7 h. |

Ainsi, seul de ces trois corps, l'acide borique présente une influence analogue sur la coagulation pectique et la coagulation du lait par la présure. Nous retrouverons, à propos de la tyrosinase, l'action coagulante de l'acide borique, qui nous apparaîtra alors comme un phénomène général sur la coagulation, d'ordre probablement physique.

### § III. — Diastases oxydantes

Laccase. — J'ai laissé de côté l'étude de l'action de l'acide borique sur la laccase. Son inactivité a été signalée dans le travail de G. Bertrand (1).

Tyrosinase. — Je me suis adressé pour ce travail aux deux bonnes sources de tyrosinase connues : l'extrait de son de

1. *Loc. cit.*

froment (1) et la macération glycérinée de Russule (*Russula Queleti* Fr.).

J'ai opéré en milieu aseptique avec l'extrait de son. Une solution de tyrosine stérilisée à l'autoclave avec des doses d'acide borique déterminées est additionnée d'extrait de son (macération aqueuse) filtré à la bougie Chamberland.

| Ac. borique en millionièmes | Coloration après 18 h. | après 24 h. | après 40 h. |
|---|---|---|---|
| 0 | noircissement net | noir | noir |
| 155 | » | noir | noir |
| 625 | liquide brunâtre | marron | brun |
| 2.500 | » | » | » |
| 7.500 | » | » | » |

C'est une influence nettement défavorable qui nous apparaît. Nous retrouvons le même phénomène encore plus accentué avec le phosphate monosodique. A doses moléculairement équivalentes, il est plus empêchant que l'acide borique sur l'action de la tyrosinase du son.

Dans les deux cas, pour les fortes doses, un louche apparaît dans la liqueur; ce louche doit être dû à une précipitation des sels de chaux qui sont en notable quantité dans l'extrait de son, et nous savons que la présence de ces sels est nécessaire à l'apparition des mélanines dans les liquides d'oxydation tyrosinasique (2). La tyrosinase du son est pour notre étude un matériel défavorable et nous pourrons mieux élucider la question en nous adressant à une tyrosinase très peu riche en sels de chaux : l'extrait glycériné de Russule sera, à ce point de vue, la préparation de choix. S'il n'est pas additionné d'une petite quantité d'un sel de chaux, il ne précipite pas les mélanines dans les solutions de tyrosine ou seulement

1. G Bertrand et W. Mutermilch. Recherches sur le mode de coloration du pain bis *Annales de l'Institut Pasteur*, t. XXI, p. 833, 1907.

2. Voir G. Bertrand. Recherches sur la mélanogénèse. *Bulletin des Sc pharmacologiques*, t. XV, p. 65, 1908.

en très faible quantité : le liquide garde une teinte marron rouge, même si l'on pousse très loin l'oxydation. L'addition d'une trace d'oxalate d'ammoniaque empêche l'apparition de toute teinte foncée ; le liquide oxalaté rosit presque instantanément, plus rapidement même que les liquides non oxalatés, mais il garde perpétuellement la teinte rouge et sa transparence.

L'addition de sels de chaux en quantité appréciable empêche au contraire tout rosissement du liquide, au fur et à mesure de l'oxydation, la substance est coagulée sous forme de mélanine et précipite en donnant au début une teinte gris-violet au liquide, puis un dépôt noir apparaît rapidement sur le fond du tube.

Il était nécessaire pour comprendre le mode d'action de l'acide borique que nous allons exposer, de préciser ces quelques points et de bien établir les deux temps de la réaction : oxydation de la tyrosine qui est le phénomène diastasique ; précipitation des produits d'oxydation sous forme de mélanine, due à la présence de sels de chaux et absolument indépendante de la présence de la diastase : on peut en effet dans les tubes oxalatés produire un précipité mélanique après destruction de la diastase par la chaleur en ajoutant un excès de sels de chaux. Nous établirons d'ailleurs sur cette possibilité de précipitation des mélanines, après destruction de la diastase, une méthode de dosage de celles-ci. Il y a dans l'action des sels de chaux sur la coagulation des mélanines analogie complète avec leur action sur la coagulation des produits de transformation de la caséine sous l'influence de la présure. Le sel de chaux, qu'il entre ou non en combinaison avec le produit d'oxydation, n'intervient que comme agent de coagulation dans le phénomène. Nous allons trouver une semblable analogie entre l'action de l'acide borique sur les oxydations tyrosinasiques et son action sur la coagulation du lait que nous avons déjà vue.

Voici deux des nombreuses expériences qualitatives faites sur l'action de l'acide borique sur la tyrosinase.

5 cc. de solution saturée de tyrosine sont additionnés de 2 gouttes d'un extrait glycériné de *Russula queleti* et de doses croissantes d'acide borique :

| Acide borique en millionièmes | | Coloration après | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 3/4 heure | 2 heures | 3 heures | 18 heures |
| 0 . . . . | rosissement immédiat. | roses | même observat. plus accentuée | roses | rouge brun |
| 250 . . . . | | | | | brun de moins en moins rouge en allant vers 5.000 |
| 500 . . . . | | la teinte rose diminue en allant vers 5.000 | | | |
| 1.250 . . . . | | | | | |
| 2.500 . . . . | | | | | |
| 5.000 . . . . | retard | | | brun rosé | |

2 cc. solution de tyrosine saturée + 1/10e cc. extrait de Russule :

| Acide borique en millionièmes | | Coloration après | |
|---|---|---|---|
| | | 2 heures | 18 heures |
| 0. . . . | rosissement immédiat. | rouges vif | rouge-brun |
| 1.000. . . . | | | brun |
| 30.000. . . . | retard | rouge-brun | brun-noir |
| Q. s. pour saturer. . . | aucune teinte après 5′ | brun jaunât. (léger ppté brun) | liquide brunâtre où flottent des particules noires visibles |

En résumé, nous voyons diminuer la teinte rouge au fur et à mesure qu'augmente la concentration en acide borique. Dès l'abord on serait tenté de croire à une influence empêchante si l'on n'était prévenu que la coloration rouge n'indi-

que rien de précis, puisqu'elle n'apparaît même plus lorsqu'on force les doses de sels de chaux ainsi que je l'ai dit plus haut. Le brunissement qui est un commencement de précipitation des mélanines apparaît très rapidement dans les tubes riches en acide borique ; un dépôt se forme même au fond du tube. Nous sommes alors tentés de rapprocher l'action de l'acide borique sur la tyrosinase de son action sur la présure et la pectase comme je le faisais prévoir tout à l'heure. L'acide borique agirait comme coagulant des mélanines, avec, comme pour ses autres actions coagulantes, une puissance bien moins grande que les sels de chaux. La démonstration que l'acide borique n'a pas d'action empêchante sur la tyrosinase et que par conséquent les modifications de teinte des liquides d'oxydation dues à sa présence ne proviennent que d'un état différent de coagulation du produit oxydé nous sera fournie par un dosage de ce produit.

Dans trois matras contenant chacun 0 gr. 5 de tyrosine dissoute dans un litre d'eau on ajoute des doses d'acide borique.

| | |
|---|---|
| I. . . . . | 0 gr. |
| II . . . . . | 5 gr. |
| III . . . . . | 30 gr. |

On additionne ensuite le liquide de chacun des matras de 50 cc. de macération glycérinée de Russule. On fait barbotter dans les matras bouchés au caoutchouc et réunis par des tubes coudés un faible courant d'air pendant 20 heures à la température du laboratoire. Après une demi-heure, les matras II et III ont bruni et ont perdu leur transparence; le I est encore transparent et d'un beau rouge acajou. Au bout des 20 heures on bouche les matras à l'ouate et on porte un quart d'heure à 110° en autoclave pour tuer la diastase et aussi stériliser les liquides dont la filtration sera longue et que les microorganismes pourraient envahir pendant ce temps. Après refroidissement on ajoute à chaque matras 10 cc. d'une solution de chlorure de calcium à 10 o/o stérilisée et on

laisse déposer 24 heures. Dans ces conditions la presque totalité des mélanines est précipitée ; la très faible quantité qui colore légèrement le liquide surnageant est impondérable. On filtre alors sur petits filtres tarés (T), on vérifie que le liquide filtré ne donne pas de précipité mélanique par addition de $CaCl^2$. Les filtres et leur contenu sont séchés à poids constant dans une étuve à 110° et on pèse (A). On calcine alors le tout avec précaution et les cendres obtenues sont pesées (B). Le poids de matière organique oxydée = A — (B + T). On a éliminé de la sorte l'erreur possible due à la précipitation des sels de chaux par l'acide borique et aux matières minérales entraînées par les mélanines. Dans ces conditions nous avons obtenu les résultats suivants :

| | Acide borique | Poids de matière organique oxydée |
|---|---|---|
| I | 0 | 0 gr. 3465 |
| II | 5.000 | 0 gr. 3524 |
| III | 30.000 | 0 gr. 3532 |

Ces chiffres permettent d'affirmer que l'acide borique n'agit pas comme empêchant de la tyrosinase. Le phénomène qualitatif observé n'est dû qu'à l'action coagulante de l'acide borique sur les mélanines. Même en présence d'oxalate d'ammoniaque les liquides d'oxydation tyrosinasiques qui ont été additionnés d'acide borique brunissent. La précipitation n'est pas complète comme avec les sels de chaux. Nous avons vu de même la formation d'un caillot lâche sous l'action de la présure dans les laits oxalatés additionnés d'acide borique.

Ces expériences contredisent le travail de J. Wolf (1) sur l'influence de la réaction du milieu sur la tyrosinase. Cet auteur prétend que les extraits de *Russula delica* ont vis-à-vis de la tyrosine un maximum d'activité voisin de la neutralité à

1. J. Wolf. Sur quelques propriétés nouvelles des oxydases de *Russula delica*. *Comptes rendus Ac. des Sc*, février 1909.

la phtaléine et non pas de la neutralité au méthylorange. Or lorsque j'obtiens en présence de 30 grammes d'acide borique par litre des oxydations de tyrosinase aussi considérables, quantitativement parlant, que celles faites en l'absence de cet acide, je me trouve assez éloigné de la neutralité à la phtaléine. La question d'acidité n'est pas, à mon avis, la seule à envisager, ou elle est plus compliquée qu'on ne le croit. Il y a des questions de présence qui entrent en jeu : le phosphate monopotassique, de même acidité vis-à-vis des réactifs colorés que l'acide borique est nettement empêchant sur la tyrosinase ; des séries d'oxydations faites avec des doses croissantes de phosphates monoalcalins montrent une teinte rose décroissant comme croît la teneur en phosphate et jamais trace de brunissement. Les phosphates bialcalins, neutres pourtant à la phtaléine, sont empêchants à toute dose. La série des citrates offre des phénomènes particuliers. Les citrates monoalcalins, acides à l'hélianthine, sont empêchants à toute dose. Le citrate bisodique, neutre à l'hélianthine, présente des phénomènes analogues à ceux qu'il présente dans son action coagulante avec la présure : existence d'une dose empêchante puis apparition d'une action favorisante sur la coagulation ; en solution N/150 et N/300, le citrate bisodique empêche le brunissement des tubes d'oxydation tyrosinasique, ils restent après 18 heures d'action d'un beau rouge acajou ; pour des doses N/60 on a une teinte rouge-brun, pour N/30, brun jaunâtre et sur le fond de ces deux tubes est apparu un léger dépôt de mélanines.

Le citrate trisodique est favorable à la coagulation des mélanines pour toutes les doses de N/300 à N/30. Pour cette dernière dose, on a une teinte violet clair du liquide avec dépôt noir analogue à celle obtenue avec un excès de $CaCl^2$. Des expériences quantitatives qui ne trouveraient pas ici leur place seraient à faire sur toutes ces actions qui ne manquent pas d'intérêt.

Au groupe des diastases oxydantes, c'est-à-dire fixant l'oxy-

gène de l'air directement, je joins celui des peroxydiastases et de la catalase pour la commodité de l'exposé.

Peroxydiastases. — L'acide borique à toute dose est inactif vis-à-vis des peroxydiastases agissant en présence d'eau oxygénée comme oxydants du gayacol et de la teinture de gaïac. M. G. Bertrand et Mlle Rozenband ont d'ailleurs signalé le fait dans une récente étude sur l'action des acides sur les peroxydiastases (1).

Catalase. — La décomposition de l'eau oxygénée par la catalase est légèrement influencée par la présence d'acide borique, surtout aux fortes concentrations. Je me suis servi d'une solution aqueuse provenant du lavage au mortier dans 40 cc. d'eau, de 25 grammes de panne de porc fraîche, très riche en catalase. Après un quart d'heure d'action sur une solution à 5 o/o de perhydrol de Merck, j'arrête l'action diastasique par addition d'acide sulfurique et je titre l'eau oxygénée non décomposée par le permanganate N/10.

| | Permanganate N/10 employé |
|---|---|
| Témoin avec diastase bouillie . | 12 cc. 8 |
| 0 acide borique . . . . . | 5 cc. 6 |
| 50 millionièmes acide borique. | 5 cc. 8 |
| 500 — — | 5 cc. 8 |
| 6.000 — — | 6 cc. 1 |
| 11.000 — — | 6 cc. 2 |
| 24.000 — — | 9 cc. 9 |

Une autre expérience m'a montré qu'en présence de 30 gr. par litre d'acide borique, il y a encore une décomposition de l'eau oxygénée. Néanmoins, la vitesse de l'action se trouve entravée notablement à partir de 6 grammes par litre, ainsi que l'indique le tableau précédent.

1. *Loc. cit.*

## § IV. — Conclusions

Résumons en peu de mots les conclusions que nous pouvons tirer de cette étude sur l'influence de l'acide borique sur les actions diastasiques.

Les diastases hydrolysantes des hydrates de carbone et des glucosides, ainsi que celles des matières protéiques, fonctionnent encore en présence d'acide borique à saturation à froid ; c'est dire que son action empêchante est bien faible. Nous avons pu établir une courbe de l'action de l'acide borique sur un certain nombre d'entre elles : sucrase, amylase pancréatique, émulsine, trypsine ; courbe qui nous a permis de ramener la réaction optima du milieu pour les trois dernières actions diastasiques à la neutralité à l'alizarine, neutralité plus sensible et correspondant mieux à l'exactitude des faits que la neutralité à l'hélianthine envisagée jusqu'ici. L'acide borique est inactif sur les oxydases et les peroxydiastases. Il gêne l'action de la catalase au fur et à mesure que sa dose croît, sans arriver cependant à l'entraver entièrement.

Par un mécanisme inexpliqué, probablement un phénomène d'ordre physique, du genre de ceux que Duclaux classe sous le nom de phénomènes d' « adhésion moléculaire » (1) et par lesquels il explique les phénomènes de coagulation, l'acide borique intervient de façon favorable sur ces derniers. Nous l'avons pu constater dans les trois cas étudiés, assez dissemblables les uns des autres : la coagulation du lait, celle de l'acide pectique et enfin celle des mélanines. Mais il me semble que dans ces derniers cas nous sommes en dehors des phénomènes diastasiques étudiés en eux-mêmes ; l'intervention a lieu sur le phénomène annexe qu'est la coagulation des produits fermés. On peut donc dire qu'en dehors de la lipodiastase, où l'on n'est d'ailleurs pas sûr qu'il agisse direc-

1. *Traité de Microbiologie*, t. II, p. 263.

tement sur la propriété diastasique, l'acide borique est un corps remarquablement inactif à la fois dans le sens favorable et le sens défavorable sur les actions des ferments solubles. La faiblesse de son action antiseptique est évidemment en relations avec cette inactivité.

Nous avons pu constater dans un des précédents chapitres combien était faible cette action antiseptique. La constatation que nous venons de faire de son action empêchante sur la lipodiastase m'a fait penser un moment que l'action antiseptique de l'acide borique, dans son emploi pour la conservation des viandes par exemple, pourrait être due à une action empêchante de la digestion des graisses par les microorganismes.

J'ai cultivé sur du beurre émulsionné dans du liquide de Raulin non sucré du *Penicillium glaucum*.

Dans deux fioles d'Erlenmeyer on met 5 grammes de beurre émulsionné avec 5 cc. de Raulin sans sucre. Dans l'une d'elles on ajoute 0 mgr. 5 d'acide borique. On ensemence avec une culture de *P. glaucum*. Au bout d'une dizaine de jours, on titre l'acidité et on pèse les mycéliums après lavage à l'éther et dessiccation.

| | Poids du mycélium | Soude N correspondant aux acides formés |
|---|---|---|
| | — | — |
| I. Acide borique. . . | 0,378 | 2 cc. |
| II. 50 millionièmes . . | 0,382 | 1 cc. 85 |

Il n'y a pas de différence appréciable entre les deux cultures : l'action toxique ne se manifeste pas pour de petites doses.

L'acide borique semble donc n'agir comme antiseptique qu'en empêchant la reproduction et le développement cellulaire des organismes, et pour cela de fortes doses en sont nécessaires.

En ce qui concerne le mécanisme de l'action favorisante des petites doses de bore, nous ne pouvons pas tirer grand'chose

de ce chapitre. Peut-être a-t-il un rôle général dans les phénomènes de coagulation comme adjuvant des sels de chaux. En tous cas, il ne paraît pas avoir sur aucune des diastases étudiées un rôle analogue à celui du manganèse sur la laccase. Le rôle catalytique du bore reste à découvrir.

# CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Nous nous étions proposés, au début de ce travail, un triple but :

1° S'assurer de la présence normale et constante du bore chez les végétaux ;

2° Rechercher l'utilité de cet élément ;

3° Essayer de définir son rôle.

Les études exposées dans la première partie permettent d'une part d'affirmer la présence constante du bore dans le règne végétal, d'autre part de limiter les quantités normales de cet élément. La plus forte teneur en bore que nous ayons rencontrée ne dépasse pas 0 gr. 2 de bore, correspondant à 1 gr. 17 d'acide borique pour 100 grammes de cendres (écorce de bouleau).

Dans la seconde partie, nous avons vu son inactivité sur la levure, le ferment bulgare et l'*Aspergillus niger ;* l'action antiseptique ne nous a paru porter que sur la reproduction des organismes : la levure en masse fermente encore le glucose dans une solution saturée d'acide borique (30 à 40 grammes par litre). Son action sur la germination des graines semble se rapprocher de son action sur les organismes inférieurs : inactivité aux petites doses, action empêchante aux fortes doses ; il est vrai que la graine apporte avec elle une certaine quantité de bore qui est peut-être suffisant à la première croissance de la plante.

Sur la croissance des végétaux supérieurs, j'ai pu observer l'existence d'une courbe de l'action du bore présentant pour certaines doses un optimum bien caractérisé. Existe-t-il une vie possible des végétaux supérieurs en l'absence de bore ? On ne peut répondre à cette question : les traces contenues dans la graine empêchent la réalisation d'un milieu de culture entièrement exempt de cet élément. En tout cas, l'addition aux liquides nutritifs synthétiques d'une faible dose de bore donne des augmentations de poids sec des récoltes atteignant parfois jusqu'à 59 o/o. En aucun cas, les cultures en milieu synthétique n'ont donné pour les faibles doses de bore des récoltes inférieures à celles des plants témoins, la courbe est le plus souvent très nette et l'action favorisante est observée pour plusieurs des doses employées.

En ce qui concerne les récoltes obtenues dans les conditions de la culture ordinaire, l'addition à la terre de petites quantités de bore, o gr. 5 par mètre carré, n'a jamais donné de cultures inférieures aux cultures témoins. C'est une dose très favorable à la culture du maïs, du colza, du navet. Pour d'autres plantes (pois, avoine), c'est une dose indifférente ; la dose optima, évidemment inférieure, n'a pas été déterminée.

Il faut, bien entendu, se rappeler que la terre contient des traces de bore que la plante va chercher par ses racines et accumule selon ses besoins. En pot, les doses favorables paraissent plus élevées par rapport à la surface de terre offerte qu'en sol libre ; cela tient à ce que la plante ne dispose que d'un petit volume de terre et ne peut pas étendre au loin ses racines à la recherche de l'élément rare.

Il y aurait avantage à employer le bore comme *engrais catalytique* ; les expériences que j'ai exposées montre qu'il présente une valeur culturale égale à peu près à celle du manganèse. Il faudrait multiplier les expériences sur des plantes variées et opérer dans les conditions de la grande culture, afin de déterminer d'une manière précise les conditions de son emploi.

Le bore apparaît donc bien comme jouant un rôle dans la

vie des végétaux supérieurs : mes expériences en milieu stérile rendent en effet sans valeur l'objection qu'on peut faire de l'existence de son action antiseptique et du rôle qu'il pourrai ainsi jouer pour protéger dans le sol les racines contre l'infection ; nous avons d'ailleurs vu à plusieurs reprises ce qu'on peut penser de son action antiseptique aux petites doses ; quant à l'objection d'une action due à la simple acidification du milieu, nous avons vu quelle était la faiblesse de l'acidité borique dans l'étude des phénomènes diastasiques ; le sol d'ailleurs renferme un excès de carbonate de chaux.

Quel est donc le rôle physiologique du bore ? Rien dans les recherches exposées ne permet de le prévoir d'une façon précise. Il ne paraît pas être général : d'après quelques expériences de Jay, les animaux éliminent le bore ; d'autre part, les végétaux inférieurs ne nous ont pas semblé profiter de l'addition de petites quantités de bore aux milieux. Par sa présence et son utilité, il paraît être particulier aux végétaux supérieurs en pleine croissance. Son abondance chez les plantes vivaces, surtout dans les parties lignifiées et l'écorce, feraient aisément penser à une action sur la formation des tissus vasculaires ou des composés qui imprègnent ces tissus. Les cultures forestières auraient peut-être plus que toutes autres à bénéficier d'additions de bore au sol ; les essais dans cette voie nécessitent des années d'expérimentation. Peut-être joue-t-il un rôle catalytique dans certains phénomènes de coagulation, les seuls sur lesquels nous avons vu agir nettement l'acide borique dans les études sur les diastases.

Au point de vue théorique, l'utilité apparente du bore vis-à-vis d'un groupe restreint d'individus apparaît comme une objection à la théorie de l'identité de composition chimique qualitative de la matière vivante pour tous les êtres vivants.

Cette théorie, enseignée par M. G. Bertrand est parfaitement d'accord avec tous les faits analytiques connus ; d'après les analyses de Jay, cependant, le bore apparaissait comme le seul cas aberrant par sa présence chez les végétaux seuls. De

nouveaux travaux sur la présence du bore chez les animaux sont nécessaires avant que l'on puisse se former une opinion définitive sur la question (1). Quels que soient les résultats analytiques que puissent donner ces recherches, il faut se rappeler que de la présence d'un élément chez un être vivant on ne peut conclure à l'utilité de cet élément, on ne peut affirmer qu'il est fonction nécessaire des manifestations vitales. Il faut distinguer entre la composition chimique immédiate donnée par la méthode analytique et la composition chimique nécessaire et suffisante des êtres vivants que peut seul nous donner l'emploi combiné de l'analyse et de la synthèse.

Les résultats de mes expériences synthétiques semblent venir à l'appui d'une démonstration de l'utilité d'un élément, le bore, à un groupe d'êtres limité. Peut-être faudra-t-il retourner à la théorie de non-identité de composition chimique de la matière vivante. En ce cas, à côté de la classification en éléments plastiques et éléments catalytiques, on pourra établir une classification en :

*Eléments fondamentaux*, nécessaires à tous les êtres vivants; ils sont ou plastiques comme le carbone, l'oxygène, l'hydrogène, l'azote, ou catalytiques.

*Eléments particuliers*, caractéristiques d'un groupe d'individus, d'une vie dans des conditions particulières : la silice sera un élément plastique de ce groupe, le bore en sera un élément catalytique.

Et peut-être aussi *Eléments indifférents*, présents dans l'individu parce qu'ils sont présents dans le milieu, mais n'ayant aucun rôle.

Ce ne serait qu'après de très nombreuses études du genre de celle-ci que l'on pourrait assigner une place à chaque élément dans cette nouvelle classification. En réalité, on n'aura jamais, de longtemps, le droit de placer un élément dans la

1. Ces expériences sont d'ailleurs en cours au laboratoire de M. G. Bertrand.

série des éléments indifférents, car de ce qu'on ne lui trouvera pas de rôle chez de nombreux individus, on n'en pourra pas conclure qu'il n'en présente chez aucun.

La vie en présence des seuls *éléments fondamentaux*, présents et utiles chez tous les êtres vivants peut être considérée comme une première approximation dans l'étude de la composition élémentaire comparée des êtres vivants ; elle n'est pas encore définitive. Chaque série d'individus, adaptés à des milieux quantitativements différents par une longue hérédité, chez lesquels prédominent des fonctions différentes, a, sans doute, probablement besoin d'éléments particuliers ; les causes chimiques et les différences morphologiques se touchent peut-être de très près. Le bore serait l'*élément particulier* type des formes supérieures du règne végétal.

# TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION.

§ I. — A. Composition élémentaire des êtres vivants : éléments plastiques et éléments catalytiques. . . . . 1

B. Utilité et rôle des éléments : méthode analytique et méthode synthétique. . . . . 4

§ II. — Application pratique : les engrais catalytiques . . . 5

**PREMIÈRE PARTIE**

**Méthode analytique : Recherche et dosage du bore chez les végétaux.**

CHAPITRE PREMIER. — *Les méthodes de recherche du bore.*

§ I. — Etat du bore dans la nature. . . . . 9

§ II. — Quelques propriétés générales de l'acide borique . . 10

§ III. — Méthodes de recherche à la flamme et au spectroscope.

A. Historique . . . . . 11

B. Méthode employée au cours du travail . . . . . 15

§ IV. — Méthode de recherche par la coloration sur papier de curcuma.

A. Historique . . . . . 19

B. Nouvelles recherches et méthode employée . . . . 23

CHAPITRE II. — *Dissémination du bore dans la nature.*

§ I. — Historique.

A. Présence dans les roches, la mer et les eaux minérales naturelles . . . . . 30

B. Présence dans les produits végétaux. . . . . 32

§ II. — Recherches personnelles. . . . . 34

CHAPITRE III. — *Les méthodes de dosage de l'acide borique.*

§ I. — Historique . . . . . 38

§ II. — Méthode employée par l'auteur. . . . . 48

Pages

CHAPITRE IV. — *Dosage de l'acide borique chez les végétaux.*

§ I. — Historique . . . . . 54
§ II. — Recherches personnelles. . . . . 54

## DEUXIÈME PARTIE

### Méthode synthétique : Utilité du bore chez les végétaux.

CHAPITRE PREMIER. — *Action de l'acide borique sur quelques végétaux inférieurs.* . . . . . 61

§ I. — Action sur la levure . . . . . 63
1° Fermentation du glucose par la levure en masse. . . 65
2° Action sur le développement de la levure . . . . . 67
3° Action sur l'accoutumance des levures au galactose. . 70

§ II. — Action sur le ferment lactique . . . . . 77
§ III. — Action sur les moisissures . . . . . 80

CHAPITRE II. — *Action du bore sur les végétaux supérieurs* . . . 84

§ I. — Action de l'acide borique sur la germination . . . . 85
Fonctionnement de la membrane hémiperméable des Graminées vis-à-vis de l'acide borique . . . . . 88

§ II. — Action sur la croissance des végétaux supérieurs. — Emploi de la méthode synthétique.
1° Cultures en milieu liquide stérile . . . . . 89
2° Cultures sur sable . . . . . 95

§ III. — Expériences complémentaires : emploi de la terre arable . . . . . 100
1° Expériences en pots. . . . . 101
2° Expériences en pleine terre . . . . . 106
Epuisement du sol en bore . . . . . 112

§ IV. — Conclusions de la deuxième Partie . . . . . 114

## TROISIÈME PARTIE

### Essai de détermination du rôle catalytique du bore.

CHAPITRE UNIQUE. — *Influence de l'acide borique sur les actions diastasiques* . . . . . 117

§ I. — Diastases hydrolysantes . . . . . 120
§ II. — Diastases coagulantes. . . . . 133
§ III. — Diastases oxydantes . . . . . 139
§ IV. — Conclusions . . . . . 147

CONCLUSIONS GÉNÉRALES. . . . . 151

# DEUXIÈME THÈSE

---

## PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

**Géologie.** — Relations stratigraphiques de l'Angleterre et du bassin de Paris pendant l'ère secondaire.

**Biologie générale.** — Organismes établissant le passage entre les Protozaires et les Thallophytes.

VU ET APPROUVÉ :
Paris, le 17 décembre 1909.
*Le Doyen de la Faculté des Sciences,*
PAUL APPELL.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
*Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris,*
L. LIARD.

---

LAVAL. — IMPRIMERIE L. BARNÉOUD ET Cie.

New York Botanical Garden Library
QK753.B7 A35 gen
Agulhon, Henri/Recherches sur la presenc
3 5185 00074 4274